

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



Phlomis pungens var. *hirta* Bitkisinin Sitotoksik ve Antigenotoksik Etkilerinin Bazı *In Vitro* Testlerle Araştırılması

FRANZISKA JOHANNA WILD KORKMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Serap DOĞAN (Tez Danışmanı)
Araş. Gör. Dr. Begümhan YILMAZ KARDAŞ (Eş Danışman)
Prof. Dr. Muhsin KONUK
Prof. Dr. Oktay ARSLAN

BALIKESİR, TEMMUZ - 2022

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “*Phlomis pungens* var. *hirta* Bitkisinin Sitotoksik ve Antigenotoksik Etkilerinin Bazı *In Vitro* Testlerle Araştırılması” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Franziska Johanna WILD KORKMAZ

(imza)

Bu tez çalışması BAP tarafından 2021/110 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

***PHLOMIS PUNGENS* VAR. *HIRTA* BİTKİSİNİN SİTOTOKSİK VE
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN BAZI *IN VITRO* TESTLERLE
ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
FRANZISKA JOHANNA WILD KORKMAZ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)
(EŞ DANIŞMAN: ARAŞ. GÖR. DR. BEGÜMHAN YILMAZ KARDAŞ)
BALIKESİR, TEMMUZ - 2022**

Reaktif oksijen türleri ve vücudun doğal antioksidan kapasitesi arasındaki dengesizlikler hem sitotoksik hem de genotoksik hasarlara yol açmaktadır. Tıbbi bitkilerde fenolikler ve flavonoidler gibi antioksidan moleküllerin bol bulunması hücrel ve genomik hasardan kaynaklanan hastalıklarından korunmaya katkıda bulunabilmektedirler. Lamiaceae familyasına ait olan şifalı bitkiler antimikrobiyal, antienflamatuar ve antioksidasyon gibi önemli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Bu çalışmada, Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin antioksidan kapasitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ve demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemleri ile belirlenmiştir. Daha sonra, *Phlomis pungens* var. *hirta* türünün su, metanol ve etanol ekstraktlarının insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etki MTS testi ile araştırılmıştır. Hidrojen peroksit (H₂O₂) ile indüklenmiş insan lenfosit hücreleri üzerindeki antigenotoksik etki ise mikronükleus testi ile belirlenmiştir ve hücrelerde meydana gelen oksidatif DNA hasar miktarı 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Ayrıca, *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin antibakteriyel aktivitesi ve hemouyumluluğu araştırılmıştır.

Sonuç olarak, *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin metanol ekstraktı, su ve etanol ekstraktlarına göre en yüksek antioksidan ve metal şelatlama kapasitesi göstermiştir. Sitotoksisite testi, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreçlerinde özellikle metanol ve etanol ekstraktlarının artan konsantrasyonu ile insan lenfosit hücrelerin yaşamlılığının azalttığını göstermiştir. Su, metanol ve etanol ekstraktlarının H₂O₂'in insan lenfosit hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı üzerinde antigenotoksik etkiye sahip olduğunu gözlemlenmiştir. Ayrıca, hücrelerde meydana gelen oksidatif DNA hasar miktarının bitki ekstraktları ile inkübasyon sonrasında azaldığını tespit edilmiştir. *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin gram negatif bakteri türü olan *Aeromonas* spp.'e karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ve hemouyumlu bir bitki olduğu gözlemlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Lamiaceae, *Phlomis pungens* var. *hirta*, sitotoksisite, antigenotoksisite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF *PHLOMIS PUNGENS* VAR. *HIRTA* WITH SOME *IN VITRO* TESTS

MSc THESIS

FRANZISKA JOHANNA WILD KORKMAZ
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOĞAN)
(CO-SUPERVISOR: DR. BEĞÜMHAN YILMAZ KARDAŞ)
BALIKESİR, JULY - 2022

The imbalance between reactive oxygen species and the body's natural antioxidant capacity causes both cytotoxic and genotoxic damage. The abundance of antioxidant molecules such as phenolics and flavonoids in medicinal plants may contribute to the protection of diseases caused by cellular and genomic damage. In this study, the antioxidant capacity of *Phlomis pungens* var. *hirta*, a member of the Lamiaceae family, was determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods. The cytotoxic effects of water, methanol and ethanol extracts of *Phlomis pungens* var. *hirta* on human lymphocyte cells were investigated by the MTS test. The antigenotoxic effect on human lymphocyte cells induced by H₂O₂ was determined by the micronucleus test and the amount of oxidative DNA damage in the cells was tested by the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ELISA method. Also, the antibacterial activity and hemocompatibility were investigated.

Methanol extract showed the highest antioxidant and metal chelating capacity compared to water and ethanol extracts. The cytotoxicity test showed that the viability of human lymphocyte cells decreased especially with the increasing concentration of methanol and ethanol extracts during the 24 and 48-hours incubation periods. It has been determined that water, methanol and ethanol extracts have antigenotoxic effects on DNA damage caused by H₂O₂ in human lymphocyte cells. In addition, it was determined that the amount of oxidative DNA damage in cells decreased after incubation with the extracts. It has been observed that the plant is hemocompatible and has the highest antibacterial activity against the negative bacteria *Aeromonas* spp.

KEYWORDS: Lamiaceae, *Phlomis pungens* var. *hirta*, cytotoxicity, antigenotoxicity.

Science Code / Codes : 20326, 20610, 20308

Page Number : 66

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Lamiaceae Familyası Hakkında Genel Bilgi	2
1.1.1 <i>Phlomis</i> L. Hakkında Genel Bilgi.....	3
1.1.1.1 <i>Phlomis pungens</i> var. <i>hirta</i>	3
1.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	4
1.2.1 Hidrojen Peroksit	6
1.3 Antioksidanlar	7
1.3.1 DPPH.....	10
1.3.2 ABTS.....	10
1.3.3 FRAP.....	11
1.4 Hücre Kültürü ve Sitotoksisite	12
1.4.1 Tetrazolyum Tuzları İle Yapılan Sitotoksisite Testleri.....	13
1.4.2 MTS.....	13
1.5 Genotoksisite	13
1.5.1 Genotoksisite Testleri	15
1.5.1.1 Mikronükleus Testi.....	15
1.5.1.2 8-OhdG ELISA Testi.....	16
1.6 Antibakteriyel Aktivite	17
1.6.1 Disk Difüzyon Yöntemi.....	18
1.7 Hemouyumluluk	18
1.8 Literatür Özeti.....	19
1.9 Çalışmanın Amacı	21

2. MATERYAL VE METOT	23
2.1 Materyal.....	23
2.1.1 Deneý Çalıřmalarında Kullanılan Kimyasal ve Laboratuvar Malzemeleri.....	23
2.1.2 Deneý Çalıřmalarında Kullanılan Laboratuvar Cihazları.....	25
2.2 Metot.....	25
2.2.1 Bitki Örneklerrinin Toplanması ve Ekstraktlarının Hazırlanması.....	25
2.2.1.1 Bitki Materyallerinin Temini.....	25
2.2.1.2 Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması.....	26
2.2.2 Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi.....	26
2.2.2.1 DPPH Yöntemi.....	26
2.2.2.2 ABTS Yöntemi.....	26
2.2.2.3 FRAP Yöntemi.....	26
2.2.3 Kandan Lenfosit Kültürün Oluşturulması	27
2.2.4 Sitotoksisitenin Belirlenmesi	27
2.2.4.1 MTS Testi.....	27
2.2.5 Genotoksisitenin Belirlenmesi.....	28
2.2.5.1 Mikronükleus Testi.....	28
2.2.5.2 Oksidatif DNA Hasarının Belirlenmesi	28
2.2.6 Aktibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi	30
2.2.7 Hemouyumluluk Testi	31
2.2.8 İstatistik.....	31
3. BULGULAR.....	32
3.1 Antioksidan Kapasitesi Bulguları	32
3.1.1 DPPH Sonuçları.....	32
3.1.2 ABTS Sonuçları.....	32
3.1.3 FRAP Sonuçları.....	33
3.2 Sitotoksisite Bulguları	33
3.2.1 Su Ekstraktın MTS Testi Sonuçları	33
3.2.2 Metanol Ekstraktın MTS Testi Sonuçları	34
3.2.3 Etanol Ekstraktın MTS Testi Sonuçları	34
3.3 Genotoksisite Bulguları	35
3.3.1 Mikronükleus Testi Sonuçları.....	35
3.3.2 8-OHdG Tespitin Sonuçları	36
3.3.3 Antibakteriyel Aktivitesi Bulguları	36

3.3.4 Hemouyumluluk Bulguları	38
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	39
4.1 Antioksidan Kapasitesi Sonuçları.....	39
4.2 Sitotoksisite Sonuçları	41
4.3 Antigenotoksisite Sonuçları.....	43
4.4 Antibakteriyel Aktivite Sonuçları.....	46
4.5 Hemouyumluluk Sonucu	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
6. KAYNAKLAR.....	50
EKLER.....	64
EK A Etik Kurul Kararı.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: <i>Phlomis pungens</i> var. <i>hirta</i>	4
Şekil 1.2: Antioksidanlar ve serbest radikaller arasındaki dengesizlik	5
Şekil 1.3: Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu.....	6
Şekil 1.4: DPPH radikal süpürme kapasitesi testinin prensibi	10
Şekil 1.5: ABTS'nin persülfatla oksidasyonu	11
Şekil 1.6: Genotoksinlerin etki mekanizması ve sonuçları.....	14
Şekil 1.7: 8-OHdG oluşumu	16
Şekil 1.8: Tez kapsamını özetleyen diyagram.	22
Şekil 3.1: Su ekstraktın 24 ve 48 saatlik MTS testin sonuçları.	33
Şekil 3.2: Metanol ekstraktın 24 ve 48 saatlik MTS testin sonuçları.	34
Şekil 3.3: Etanol ekstraktın 24 ve 48 saatlik MTS testin sonuçları.	34
Şekil 3.4: 8-OHdG tespitinin sonuçları.....	36
Şekil 3.5: <i>Phlomis pungens</i> var. <i>hirta</i> bitkisinin antibakteriyel aktivitesi.....	37
Şekil A.1: Etik Kurul Kararı Sayfa 1.....	64
Şekil A.2: Etik Kurul Kararı Sayfa 2.....	65

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Antioksidanların karakterizasyonu (Kasapçopur Özel & Birdane, 2014).	9
Tablo 2.1: Kimyasal ve laboratuvar malzemeleri listesi.	23
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları.....	25
Tablo 3.1: DPPH sonuçları (ortalama \pm standart sapma).....	32
Tablo 3.2: ABTS sonuçları (ortalama \pm standart sapma).....	32
Tablo 3.3: FRAP sonuçları (ortalama \pm standart sapma).....	33
Tablo 3.4: Mikronükleus testin sonucunda %MN ve NBİ oranları (ortalama \pm standart sapma).	35
Tablo 3.5: <i>Phlomis pungens</i> var. <i>hirta</i> bitkisinin antibakteriyel aktivitesi.	37
Tablo 3.6: <i>Phlomis pungens</i> var. <i>hirta</i> bitkisinin hemoliz oranı.....	38

SEMBOL LİSTESİ

8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
ABTS	: 2,2-azinobis (3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit)
CO₂	: Karbondioksit
CytB	: Sitokalsin-B
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamintetra asetik asit
FBS	: Fetal bovine serum
FRAP	: Demir iyonu icirgeyici antioksidan güç
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IC₅₀	: %50 inhibitör konsantrasyonu
KCl	: Potasyum klorür
MN	: Mikronükleud
MTS	:3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3- karboksimetoksifenil)-2-(4- sulfofenil)-2H-tetrazoliyum)
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyumbromür
NaCl	: Sodyum klorit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBİ	: Nükleer bölünme indeksi
O₂•	: Süperoksit anyonu
OH•	: Hidroksil iyonu
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
STD	: Standart sapma
WST	: 4-[3-(4-İyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disülfonat
XTT	: 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid

ÖNSÖZ

Lisans eğitimimin birinci günü itibaren beni destekleyen, bana güvenen ve bilgi birikimi ve tecrübesini hiçbir zaman benden esirgemeyen çok saygı ve sevgi duyduğum sayın danışman hocam Prof. Dr. Serap DOĞAN'a en içten teşekkür ederim.

Eş danışmanlığımı yaparak, tez çalışmam sürecinde çok büyük emekleri olan, kıymetli bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan ve pozitif enerjisiyle beni destekleyen sevgili hocam Araş. Gör. Dr. Begümhan YILMAZ KARDAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca her zaman yardımda bulunan ve bilimsel destek ile yanımda olan sevgili hocam Uzm. Dr. Mehmet Emin DİKEN'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum ve her türlü zorluğu birlikte aştığımız çok sevgili laboratuvar arkadaşlarım Saliha AYDIN, Hamza BAYHAN ve Sedef KIRDAR'a çok teşekkür ederim.

Bana sonsuz destek olan ve her zaman ileriye bakmamı sağlayan eşim Birkan KORKMAZ'a ve bugüne gelmemde her türlü desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Balıkesir, 2022

Franziska Johanna WILD KORKMAZ

1. GİRİŞ

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücrel üretimini antioksidan kapasitesini aştığı zaman meydana gelip lipidler, proteinler ve DNA gibi hücrel makromoleküllerde hasara yol açmaktadır ve ateroskleroz, diyabet, kanser, nörodejenerasyon ve yaşlanma gibi hastalık durumlarıyla ilişkilendirilmektedir (Thannickal & Fanburg, 2000; Ray et al., 2012). Doğal antioksidanlar, ham özler veya kimyasal bileşenleri formunda, oksidatif stresin neden olduğu yıkıcı süreçleri önlemede çok etkilidir (Saeed et al., 2012). Son yıllarda, içeriklerinde bulunan polifenoller, flavonoidler ve fenolik asitlerin hidrojen verme ve metal şelatlama kapasitelerine bağlı olarak antioksidan özellikler sergileyen şifalı bitkiler dikkat çekmektedir. Fenolik bileşikler, ROS'ları temizleyerek ve konakçı antioksidan savunma sistemlerini artırarak genotoksik kanserojenlerin zararlı etkilerine karşı koruyucu etki göstermektedirler (Üstün Alkan et al., 2012). Polifenoller gibi bitki sekonder metabolitleri, serbest radikal temizleyicileri, metal iyon şelatörleri ve indirgeyici maddeler olarak görev yapabilmektedirler (Balant et al., 2019). Literatür incelemeleri, bitkisel ilaçların (özellikle Asteraceae, Rosaceae ve Lamiaceae gibi büyük familyalardan üretilen) farmakolojik ve biyolojik aktif maddeler içermeleri sebebiyle hastalıkların tedavisi için eski zamanlardan beri kullanıldığını ve hala yeni farmakolojik ajanların geliştirilmesinde öncü görevleri olduğunu göstermektedir (Sytar et al., 2018; Celikler et al., 2009). Bitkilerde bulunan polifenollerin antioksidan özelliklerine ek olarak antienflamatuar, antiaterojenik, antitrombotik ve antimutajenik özellikleri taşıdıkları da bilinmektedir (Gorzynik-Debicka et al., 2018).

Geleneksel tıpta şifalı bitkilerin kullanımı yaygındır ve hala yeni farmakolojik ajanların geliştirilmesine öncülük etmektedir. Birçok bitki türü ve bitkinin koruyucu etkisinin, dokularında bulunan antioksidan ve antigenotoksik bileşenlerin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Son zamanlarda, kanserojen etkileri nedeniyle kısıtlanan sentetik antioksidanların yerine gıdalarda veya tıbbi malzemelerde kullanılacak doğal antioksidanların bulunmasına ilgi önemli ölçüde artmıştır (Celikler et al., 2009). Bu amaçla geleneksel olarak kullanılan yaygın bitki ailelerinden biri Lamiaceae'dir ve bu aile çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan bitkiler açısından zengindir (Ekin et al., 2019).

Bu çalışmada, Lamiaceae ailesinin bir üyesi olan *Phlomis pungens* var. *hirta* türünün su, metanol ve etanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2-azinobis (3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit) (ABTS) ve demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemleri ile belirlenmiştir. Daha sonra, bu ekstraktların insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTS testi ile araştırılmıştır. Hidrojen peroksit (H₂O₂) ile indüklenmiş insan lenfosit hücreleri üzerindeki antigenotoksik etki ise mikronükleus testi ile belirlenmiştir ve hücrelerde meydana gelen oksidatif DNA hasar miktarı 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Ayrıca, bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi ve hemouyumluluğu da araştırılmıştır.

1.1 Lamiaceae Familyası Hakkında Genel Bilgi

Türkiye'nin farklı iklim ve coğrafi yapısı, değişik vejetasyonlardaki zengin bir flora ve biyoçeşitliliğe yol açmaktadır (Kocabas et al., 2017). Türkiye bitki çeşitliliği açısından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir. Türkiye florası yaklaşık 11.707 çiçekli bitki türü içerir ve Avrupa, Kuzey Afrika ve Orta Doğu'daki ülkelerinin en zenginidir (Kuşaksız, 2019). Lamiaceae, Türkiye'deki tüm bitki ailelerinin en büyük üçüncü ailesidir. Ailenin 48 cins ve 782 taksonu vardır, bunların 346 taksonu (yaklaşık %44) ülkede endemiktir. Türkiye, dünyadaki tüm Lamiaceae üyelerinin yaklaşık %10'una sahiptir. Ülkedeki en büyük beş cins *Stachys*, *Salvia*, *Sideritis*, *Phlomis* ve *Teucrium*'dur (Celep & Dirmenci, 2017).

Lamiaceae familyasının çok çeşitli farmakolojik, tıbbi ve endüstriyel özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Özkan et al., 2009). Bu bitki ailesinin üyeleri hemen hemen tüm habitat türlerinde ve tüm yüksekliklerde büyüyebilir ve çoğunlukla tek yıllık veya çok yıllık aromatik bitkilerden oluşan ot ve çalılardan oluşur. (Maral et al., 2017). Lamiaceae familyası çeşitli biyolojik aktivitelere sahip bitkiler açısından zengindir ve birçok türü geleneksel olarak çeşitli hastalıklar için kullanılmaktadır (Ekin et al., 2019). Ayrıca, Lamiaceae'nin ot ve baharatları, dünya pazarlarına ihraç edilen ürünlerin önemli bir kısmını oluşturarak önemli bir ticaret geliri oluşturur. Bu familyanın bitkileri de çoğunlukla çay veya baharat olarak çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Maral et al., 2017). Lamiaceae familyası, sakinleştirici ve rahatlatıcı etkisi olan bitkilerin ana kaynağıdır ve üyeler ayrıca güçlendirici ve stimüle edici özellikleri göstermektedirler. Bu familyaya ait

olan bitkilerde bulunan aktif bileşiklerin doğal antibakteriyel, antioksidan, antifungal ve antitümör etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu özellikleri ile Lamiaceae üyeleri çeşitli hastalıkların tedavisinde sentetik ürünlere uygun alternatifler olabilmektedirler (Cocan et al., 2018).

1.1.1 *Phlomis* Hakkında Genel Bilgi

Phlomis, Lamiaceae familyasına ait bir cinistir ve Türkiye'de Ballık otu, Şalvar otu, Çalba veya Şalba olarak yerel isimlerle tanınır. Avrupa-Asya ve Kuzey Afrika'da dağılan 100'den fazla bitki veya çalı türüne sahip olan *Phlomis* cinsinin Türkiye'de 6 çeşit, 12 doğal melez ve 34 endemik takson olmak üzere 52 taksonunun yetiştiği bilinmektedir (Kyriakopoulou et al., 2001; Demirci et al., 2006). Geleneksel Türk halk tıbbında, *Phlomis* türünün çiçekleri ve / veya yaprakları, bitki çayları, tonik, gaz giderici, iştah açıcı ve mide ağrısına yönelik yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel kullanımın yanı sıra, *Phlomis*'in antidiyabetik, ülserojenik, antimikrobiyal, antienflamatuar, antinosiseptif, antimitagenik, immünosupresif ve serbest radikal temizleme özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *Phlomis* cinsinin fitokimyasal incelemeleri, bu bitkilerin iridoidler, flavonoidler, fenilpropanoidler, feniletanoidler, lignanlar, neolignanlar, diterpenoidler, alkaloidler ve uçucu yağları içerdiğini ortaya çıkarmıştır (Ulukanli & Akkaya, 2011).

1.1.1.1 *Phlomis pungens* var. *hirta*

Phlomis cinsine ait olan *Phlomis pungens* var. *hirta* türü Türkiye'de halk arasında çalba veya ballıkotu olarak bilinmektedir (Özkan et al., 2009). Bu tür 70 cm kadar büyüeyebilen yumuşak tüylü, yıldız şeklinde çok yıllık otsu bir bitkidir. Oluşan fındıksı meyveler tüysüzdür. 800-1750 m yükseltilerde yaygın olarak bulunan *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin çiçekleme zamanı Haziran-Ağustos aylar arasındadır ve özellikle bozkırlar, otlaklar, nadas tarlalar, *Pinus* ormanları, yol kenarları ve kurak taşlı yamaçlarda yetişmektedir (Davis, 1972). *Phlomis pungens* var. *hirta* türünün fotoğrafı Şekil 1.1 de gösterilmiştir.

Literatür incelendiğinde *Phlomis pungens* var. *hirta* ile ilgili az sayıda çalışmanın bulunduğu görülmektedir. Bu çalışmalardan birinde, Kocabaş ve arkadaşları Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Avşar Kampüsü ve çevresindeki alanda tespit edilen *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin yaprak kısımlarının yara iyileştirici

özelliklerine sahip olduğunu göstermişlerdir (Kocabas et al., 2017). Ulukanlı ve Akkaya ise *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin hekzan, aseton ve metanol ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonunda *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin hekzan ekstraktının çeşitli düzeylerde antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir (Ulukanli & Akkaya, 2011). Özcelik ve arkadaşları, *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin petrol eteri ve metanol ekstraktlarında antiviral, antibakteriyel ve antifungal etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, bitki ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktivitesi gösterdiğini ancak antiviral aktivite göstermediğini belirlemişlerdir (Özcelik et al., 2010). Özkan ve arkadaşları da *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin yaprak ve çiçeklerin metanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir ve bitki ekstraktlarının özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis*'e karşı etki gösterdiğini bulmuşlardır (Özkan et al., 2009).

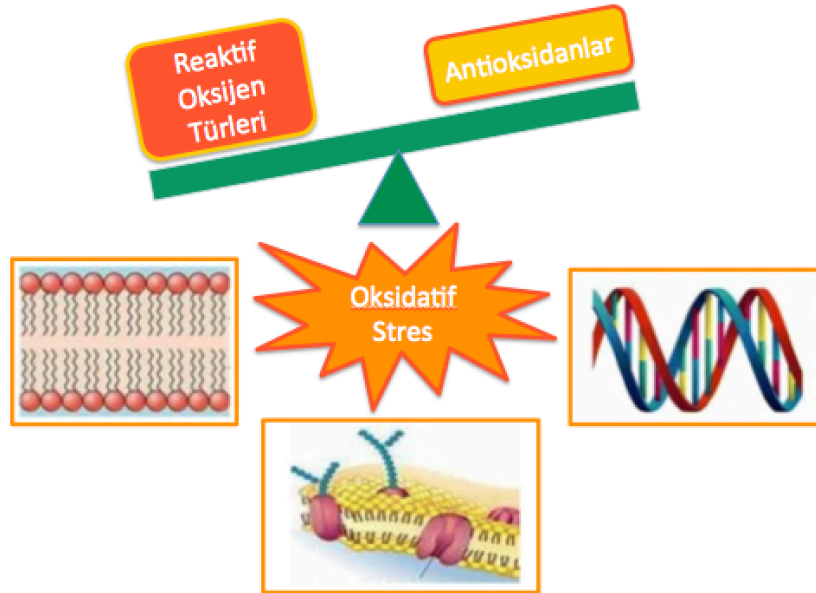


Şekil 1.1: *Phlomis pungens* var. *hirta* (Zengin, 2020).

1.2 Reaktif Oksijen Türleri

Oksidatif stres, sağlıklı insan hücrelerinde biyolojik makromoleküllerle elektron eşleşmesi yoluyla stabilize arayan ve lipit oksidasyonun yanında protein ve DNA hasarına neden olan serbest radikaller tarafından başlatılmaktadır. Oksidatif stres, vücuttaki serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik olarak da tanımlanabilir ve karsinogenez, nörodejenerasyon, ateroskleroz, diyabet ve yaşlanma ile ilişkilendirilmektedir (S. Kumar & Pandey, 2015; Ray et al., 2012). Serbest radikaller, dış kabuklarında bir veya daha fazla

eşleşmemiş elektron bulunan oldukça reaktif atomlar veya moleküllerdir ve oksijen belirli moleküllerle etkileşime girdiğinde oluşabilmektedirler. Bu radikaller, hücrelerde tek bir elektronun kaybedilmesi veya alınmasıyla üretilebilir ve bu nedenle oksitleyici veya indirgeyici maddeler gibi davranırlar (Liguori et al., 2018). Oksijenden türetilen serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılmaktadır. (S. Kumar & Pandey, 2015) Süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi ROS'lar, oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan radikal ve radikal olmayan oksijen türlerinden oluşur (Ray et al., 2012). ROS, tüm aerobik hücreler tarafından üretilir ve yaşlanmanın yanı sıra yaşa bağlı hastalıklarda da önemli bir rol oynamaktadırlar (Liguori et al., 2018). Hücresel ROS, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sürecinde olduğu gibi endojen olarak üretilebilirken ksenobiyotik bileşikler gibi eksojen kaynaklarla etkileşimlerden de oluşabilmektedir (Ray et al., 2012). Eksojen ROS kaynakları arasında su ve hava kirliliği, alkol, tütün, ilaçlar, ağır veya geçiş metalleri, endüstriyel çözücüler, yemek pişirme (örn. füme et, atık yağ) ve radyasyon bulunur (Liguori et al., 2018). İnsan vücudunda bulunan antioksidan sistem, oksidasyon ve antioksidasyon arasındaki dengeyi korumak amacıyla bu radikalleri temizleyebilmektedir (Xu et al., 2017). ROS ve hücresel antioksidan savunma sistem arasında meydana gelen dengesizlik durumu Şekil 1.2 de özetlenmiştir.

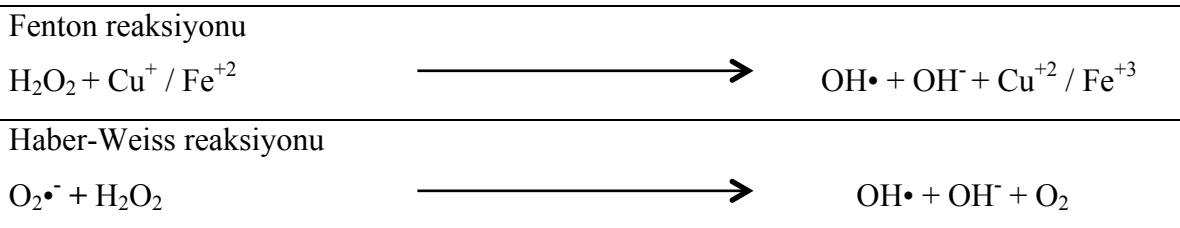


Şekil 1.2: Antioksidanlar ve serbest radikaller arasındaki dengesizlik (Özcan et al., 2015).

1.2.1 Hidrojen Peroksit

Reaktif bir oksijen türü olan H_2O_2 , canlı sistemlerde patojenlerden korunmak için yıkıcı bir oksidan olarak veya dinamik hücrel sinyal yollarında ince ayarlanmış ikinci bir haberci olarak üretilir (Lin et al., 2013). H_2O_2 , redoks tespiti, sinyal iletimi ve redoks regülasyonunda etkili olan önemli bir metabolittir. Bir haberci molekül olarak H_2O_2 , hücre şekli değişiklikleri, proliferasyonun başlaması ve bağışıklık hücrelerinin toplanması gibi ani hücrel etkileri başlatmak için hücreler ve dokulardan yayılmaktadır (Sies, 2017). Örneğin, düşük seviyelerde endojen H_2O_2 , sistein oksidasyonu üzerine sülfenik asit veya disülfür oluşumu gibi spesifik protein modifikasyonlarına yol açabilmektedir (Lin et al., 2013).

H_2O_2 , hücrel sinyal iletimin yanında endojen ROS oluşumunda da rol oynayabilmektedir. Endojen ROS'un en yaygın kaynağı nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazdır. NADPH oksidaz, hücrel solunum sürecinde NADPH'dan sağlanan elektronlarla moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesiyle meydana gelen radikal süperoksit anyonunun ($O_2\cdot$) oluşumuna neden olur. $O_2\cdot$ 'nin çoğu, süperoksit dismutaz (SOD) tarafından H_2O_2 'e ayrılır. H_2O_2 , eşleşmemiş elektronları olmadığı için serbest bir radikal değildir, ancak Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla oldukça reaktif ROS hidroksil iyonunu ($OH\cdot$) oluşturabilmektedir (Şekil 1.3). Hidroksil radikalleri son derece reaktiftir ve özellikle hücre zarlarında ve proteinlerde bulunan fosfolipidlerle reaksiyona girer (Liguori et al., 2018). Hücrel düzeyde oluşan bu oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, membran bozulması ve DNA hasarı dahil olmak üzere ciddi metabolik işlev bozukluğuna neden olabilir ve bu da sinyal iletim yollarında, gen ekspresyonunda, hücre mutagenesinde ve hücre ölümünde değişikliklere sebep olur (Ehtesham-Gharaee et al., 2015).



Şekil 1.3: Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu (Karabulut & Gülay, 2016).

1.3 Antioksidanlar

Serbest radikaller hücre membranlarına, hücre yapısındaki proteinlere, lipitlere, nükleik asitlere ve DNA'ya zarar vermektedir. Oluşan oksidatif stresin sonucunda, serbest radikaller diyabet, kanser, koroner hastalıklar, karaciğer tahribatı ve katarakt gibi birçok hastalıklara yol açmaktadır (Kasnak & Palamutoğlu, 2015). Serbest radikallerin neden olduğu bu oksidatif stresi yok etmek için, insan vücudunun kullandığı ana silah antioksidanlardır (Kasapçopur Özel & Birdane, 2014). Bir antioksidan, serbest radikale bir elektronu aktarıp nötralize ederek onun zarar verme kapasitesini azaltacak kadar kararlı bir moleküldür. Bu antioksidanlar, esas olarak serbest radikal süpürücü özellikleri aracılığıyla hücresel hasarı geciktirir veya inhibe eder (Halliwell, 1995). Düşük moleküler ağırlığına sahip olan antioksidanlar, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girer ve hayati moleküller zarar görmeden zincir reaksiyonlarını sonlandırırlar (Lobo et al., 2010). İnsanlarda antioksidanlar ya doğal olarak vücut tarafından üretilir (endojen) ya da dışarıdan alınırlar (eksojen) (Tablo 1.1) ve serbest radikal süpürücüleri olarak görev yaparak bağışıklık sisteminin etkinliğini artırır ve hastalık riskini azaltırlar (Kasapçopur Özel & Birdane, 2014). Antioksidanlar, biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini elektron transferi, metal iyon şelatlama, ortak antioksidanlar veya gen ekspresyon düzenlemesi gibi çeşitli mekanizmalarla gösterebilirler (Lobo et al., 2010).

Son zamanlarda, bazı sentetik antioksidanlar hakkında olumsuz toksikolojik raporlar ve tüketiciler arasında artan farkındalık nedeniyle, doğal antioksidanlar kullanıcılar ve araştırmacılardan büyük ilgi görmektedirler (Ramalakshmi et al., 2008). Tıbbi bitkiler, bileşimleri, fiziksel ve kimyasal özellikleri ve etki bölgeleri bakımından farklılık gösteren çok çeşitli doğal olarak oluşan antioksidanlar içerir (Bhatt et al., 2012). Fenolik antioksidanlar, hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda umut verici antioksidan aktivite gösterdikleri için bitkilerde bulunan tüm ikincil metabolitler arasında en önemlileri gibi görünmektedir. Bitki fenollerini başlıca beş ana gruba ayırılır: fenolik asitler, flavonoidler, lignanlar, stilbenler ve tanenler. Fenolik bileşikler genellikle bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bir veya daha fazla aromatik halkaya sahiptirler. Genel olarak, fenollerin antioksidan kapasitesinin, serbest hidroksil gruplarının sayısı ve yan zincirlerin aromatik halkalara konjugasyonu ile arttığı varsayılmaktadır (Kasote et al., 2015). Güçlü antioksidanlar olan fenoller ve flavonoidler çeşitli *in vitro* hücre modellerinde hidroksil radikalleri, peroksil radikalleri, hipokloröz asitler, süperoksit anyonları ve peroksinitrit

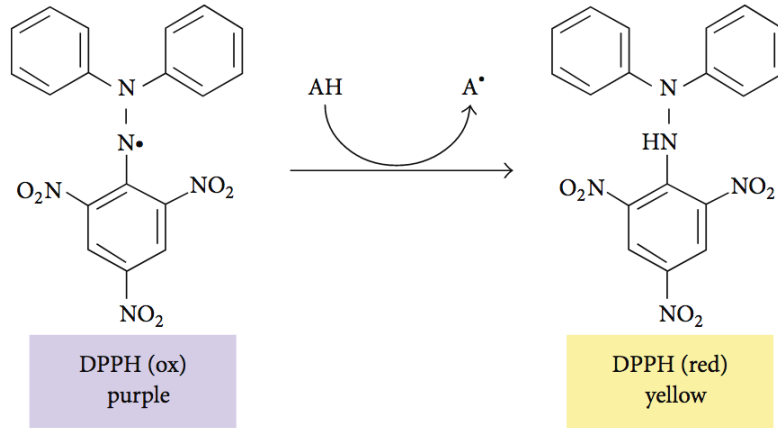
dahil olmak üzere çok çeşitli reaktif oksijen türlerini temizleyerek sürekli olarak koruyucu etkiler göstermektedirler (Bhatt et al., 2012). DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleri, doğal ürünlerin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için kullanılan yaygın yöntemlerdir (Sujarwo & Keim, 2019). Her üç yöntem elektron transferine dayanan yöntemlerdir. Bu metotların genelinde bir reaksiyon karışımında antioksidan ve oksidan olmak üzere iki bileşen mevcuttur. Oksidan antioksidandan bir elektron alıp renk değişimine uğrar. Renk değişiminin derecesi, antioksidan derişimiyle orantıda bulunmaktadır (Büyüktuncel, 2013).

Tablo 1.1: Antioksidanların karakterizasyonu (Kasapçopur Özel & Birdane, 2014).

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		
ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	NONENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	
Glutasyon peroksidaz	Glutasyon	Selenyum
Glutasyon redüklaz	Ürik asit	Koenzim Q10
Glutasyon S-transferaz	Melatonin	Transferrin
Süperoksit dismutaz	Albumin	Seruloplazmin
Katalaz	Bilirubin	α -lipoik asit
EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR		
VİTAMİN ANTİOKSİDANLAR	İLAÇ OLARAK KULLANILAN ANTİOKSİDANLAR	
β -karoten (Vitamin A)	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)	
Askorbik asit (Vitamin C)	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)	
α -Tokoferol (Vitamin E)	Trolox-C (vitamin E analogu)	
Folik asit (Vitamin B9)	Rekombinant süperoksit dismutaz	
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)	
	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)	
	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)	
	Nötrofil adezyon inhibitörler	
	Sitokinler (TNF ve IL-1)	
	Barbitüratlar Demir	
	Demir şelatörleri	

1.3.1 DPPH

DPPH serbest radikal yöntemi, çözücüsü etanol olan menekşe rengi bir çözelti kullanılarak gerçekleştirilen elektron transferine dayalı bir antioksidan tahlilidir. Oda sıcaklığında stabil olan bu serbest radikal, bir antioksidan molekülün varlığında indirgenir ve renksiz etanol çözeltisine yol açar (Şekil 1.4) (Robinson & Lutwick, 1976). DPPH yöntemi antioksidan aktivitesi ölçmek için en çok kullanılan spektrofotometrik yöntemlerden biridir. Kullanılan radikal bileşiğinin kararlı olması ve sentez gerektirmemesi sebebiyle DPPH testi antioksidanların aktivitesini değerlendirmek için geçerli, hızlı, düşük maliyetli, hızlı, kolay uygulanabilen ve ekonomik bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Seyhan, 2019). Bu yöntemin avantajı, DPPH reaktifinin en zayıf antioksidanlar da dahil olmak üzere karışımdaki tüm maddelerle etkileşebilmesi ve hem lipofilik, hem de hidrofilik antioksidanlarla reaksiyona girebilmesidir (Kedare & Singh, 2011). DPPH, nitrojen köprüsündeki bir atomunda eşleşmemiş bir elektron bulunan kararlı bir serbest radikaldir. DPPH radikalinin süpürülmesi, popüler DPPH antioksidan testinin temelidir (Sharma & Bhat, 2009). Spesifik bileşiklerin veya özlerin antioksidatif aktivitesini değerlendirmek için, örneklerin bir metanol çözeltisi içerisinde olan DPPH ile reaksiyona girmesi sağlanmaktadır. Radikal formunda DPPH, 515 nm'de absorbe olur, ancak bir antioksidan veya bir radikal tür ile indirgeme üzerine, absorpsiyon kaybolur (Cuvelier & Berset, 1995).

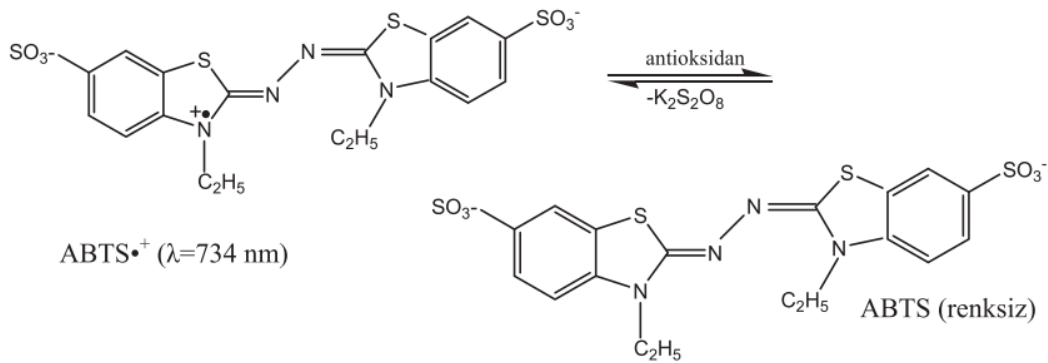


Şekil 1.4: DPPH radikal süpürme kapasitesi testinin prensibi (Teixeira et al., 2013).

1.3.2 ABTS

ABTS radikali toplam radikal temizleme kapasitesini ölçmek için kullanılan ikinci bir metottur. Bu yöntem, ABTS'nin antioksidan bileşikler tarafından renk değiştirmesi temeline dayanmaktadır (Şekil 1.5). ABTS radikali geniş bir pH aralığında stabildir. Bu

nedenle, pH'ın antioksidan mekanizma üzerindeki etkisini incelemek için kullanılabilir. ABTS radikali hem sulu hem de organik çözücülerde çözünebildiği için hem lipofilik hem de hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılabilir. ABTS radikallerinin düşük bir redoks potansiyeline sahip olmaları çoğu fenolik bileşiğin ABTS radikalleri ile reaksiyona girebilmesini sağlar, bu sebeple ABTS testi fenollerin antioksidatif kapasitesini değerlendirmek için uygundur (Büyüktünel, 2013).



Şekil 1.5: ABTS'nin persülfatla oksidasyonu (Büyüktünel, 2013).

1.3.3 FRAP

Demir iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) yöntemi de tipik bir elektron transferine dayalı testlerden birisidir ve asidik bir ortamda antioksidanlar tarafından demir iyonu (Fe^{3+}) ligand kompleksinin yoğun mavi renkli demir (Fe^{2+}) kompleksine indirgenmesini ölçen bir testtir. Antioksidan aktivite, 593 nm'de absorbans artışı olarak belirlenir ve sonuçlar bir antioksidan standardına göre ifade edilmektedir. FRAP testi, diğer elektron transfer bazlı yöntemlerden farklı olarak, demir çözünürlüğünü korumak ve elektron transferini sağlamak için asidik pH koşulları (pH 3.6) altında gerçekleştirilmektedir. FRAP testi basit, hızlı, düşük maliyetlidir ve özel ekipman gerektirmez. Başlangıçta plazmadaki indirgeme gücünü ölçmek için kullanılmıştır, ancak kullanımı diğer biyolojik sıvılarda, gıdalarda ve bitki ekstraktlarında antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için genişletilmiştir (Zhong & Shahidi, 2015).

1.4 Hücre Kültürü ve Sitotoksosite

Hücre kültürü, çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, ısı ve besin maddeleri gibi çevresel koşulların kontrol edildiği bir laboratuvar ortamında, özel olarak tasarlanmış flasklarda, kontaminasyondan arındırılarak yaşatılmasıdır. İnsan dahil herhangi bir canlıdan alınan hücrelerin yapay bir ortamda canlı tutulabilmesi, herhangi bir organ veya dokudan alınan hücrelerin kullanılabilmesi ve birçok etik kaygının ortadan kalkması nedeniyle hücre kültürü çalışmaları tercih edilmektedir. Hücre kültürü kanser, aşı çalışmaları, ilaç geliştirme ve *in vitro* sitotoksosite çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Tokur & Aksoy, 2017).

Sitotoksik, hücrelerin ölümüne neden olan anlamına gelen bir terimdir. Bir maddenin sitotoksik potansiyele sahip olup olmadığını belirlemek için sitotoksosite çalışmaları yapılır. Hücre temelli sitotoksosite çalışmaları, hayvan deneylerine alternatif olarak ortaya çıkmış ve kullanım kolaylığı ve *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerle uyumlulukları nedeniyle toksikoloji laboratuvarlarında sıklıkla tercih edilmektedir (Riss & Moravec, 2002). Sitotoksosite, araştırılan maddenin maruz kalma süresine ve dozuna bağlı olarak hücrelere değişen derecelerde hasara yol açan bir olaydır. Hücreler sitotoksik maddelere maruz kaldıklarında apoptoz, nekroz ve otofaji gibi farklı olaylar sonucunda ölebilir veya sitostatik etki sonucunda çoğalma özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi, 2009). Deneysel olarak biyolojik, kimyasal veya fiziksel faktörlere maruz bırakılan hücrelerin canlılığının belirlenmesi sitotoksosite çalışmalarında önemli bir adımdır. Hücre canlılığını belirlenebilmesi için uygulanan pek çok test mevcuttur, ancak yapılan sitotoksosite çalışmasının türü ne olursa olsun, çalışma sonunda canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesi önemlidir (Tokur & Aksoy, 2017).

Şifalı bitkiler ve aslında genel olarak bitkiler, doğada enfeksiyonlara, böceklere ve otçullara karşı bir savunma görevi gören, ancak genellikle onlarla beslenen organizmaları etkileyen toksik maddeleri sentezlemektedirler. Bu nedenle, tıbbi bitkilerin nispeten güvenli kullanımını sağlamak için onların sitotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesi gerekmektedir (de Oliveira Teixeira et al., 2003). Bitki ekstraktı gibi bir maddenin sitotoksik etkisini belirlemek için sıkça kullanılan yöntemler arasında tetrazolyum tuzları ile yapılan testler bulunmaktadır.

1.4.1 Tetrazolyum Tuzları İle Yapılan Sitotoksisite Testleri

Tetrazolyum tuzları heterosiklik organik yapılardır ve keşfedildikleri yıldan beri binden fazla üye sentezlenip tanımlanmıştır (Altman, 1976). Tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenirler ve formazan adı verilen bir yapıya dönüşerek bir renk değişimine yol açmaktadırlar. Tetrazolyum molekülünde bulunan halka sadece aktif mitokondrilerde açılır ve böylece sadece canlı hücreler öyle bir renk reaksiyonunu üretebilirler (Mosmann, 1983). Ölü hücreler ise tetrazolyum yapılarını indirgeme kabiliyetlerini kaybettikleri için bir renk değişimi meydana gelmez. MTT testinin 1983 yılında Mossman tarafından geliştirilmesinden sonra, MTS, XTT, WST-1, WST-8 gibi farklı özelliklere sahip tetrazolyum bileşikleri geliştirilmiştir (Tokur & Aksoy, 2017).

1.4.2 MTS

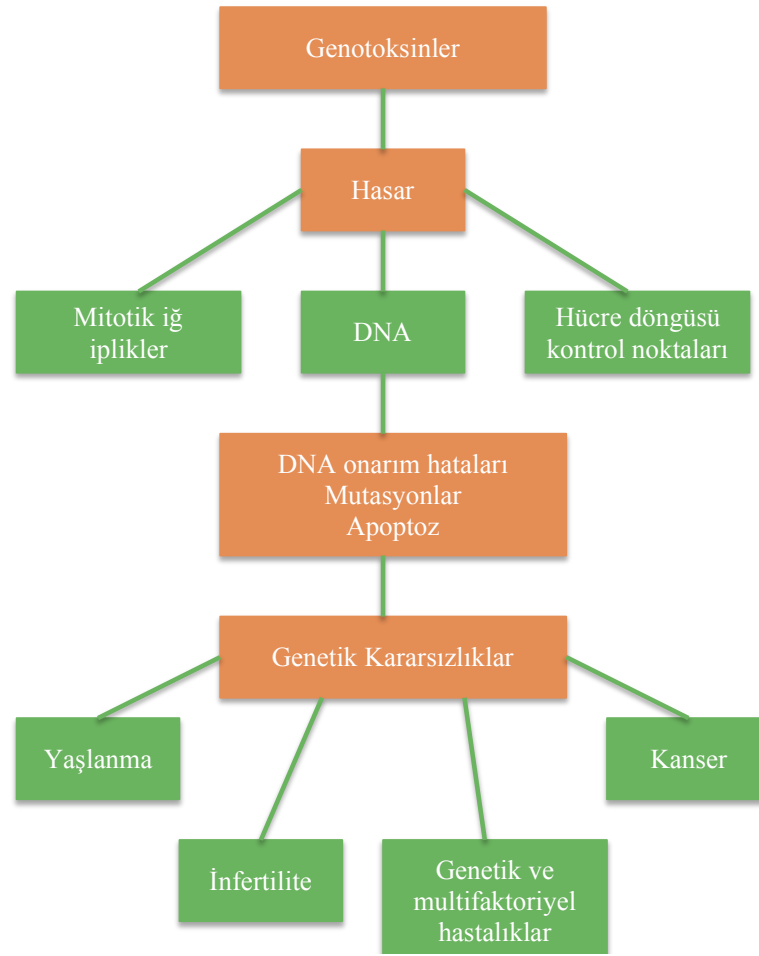
Araştırmalarda birçok tetrazolyum-formazan materyali kullanılmış olmasına rağmen, bunlardan sadece birkaçı kabul edilmiş ve biyolojik sistemlere adapte edilmiştir (Tokur & Aksoy, 2017). Bunlardan bir tanesi MTS tetrazolyum tuzudur. MTS negatif yüklü olduğu için hücre membranı kolayca geçemez ve bir ara elektron alıcı molekülü (fenazin etil sülfat, fenazin metil sülfat) ile birlikte kullanılmalıdır. Elektron alıcı molekül hücreye girer ve sitoplazma veya plazma zarından elektronları alır ve tetrazolyum bileşiğini indirgenmek için ortama geri döner. MTS'nin indirgenmesi sonucu oluşan formazan ortamda kolaylıkla çözünebilir. XTT ve WST olan tetrazolyum bileşikler aynı mantıkla çalışırken MTT öyle değildir. MTT pozitif yüklüdür ve hücreye kolayca girerek indirgenir fakat oluşan formazan suda çözünmediği için ortamda kristaller halinde çökmektedir (Riss & Moravec, 2002). MTS ile yapılan canlılık testinde ilk olarak hücreler belirli bir süre araştırılan toksik bileşiğe maruz bırakılır. Daha sonra, toksik madde uzaklaştırılır ve MTS ortama ekleyip ortalama 1-4 saat boyunca inkübe edilir. Bu inkübasyon sürecinde canlı hücreler, MTS olan tetrazolyum bileşiğini indirgeyerek formazana dönüştürür ve renk değişimi meydana gelir. Son olarak, canlı/ölü hücre sayısı belirlemek için spektrofotometrik yöntemle oluşan renk değişimi ölçülür (Tokur & Aksoy, 2017).

1.5 Genotoksisite

Araştırmacılar, genomik yapının net bir tanımını yapmadan önce bile, tehlikeli maddelerin genetik materyallerle etkileşime girebileceğini biliyorlardı. Bu tür maddeler, çeşitli

hastalıklarla (kanser dahil) ilişkili genomik kararsızlıklara ve çoklu mutasyonlara neden olabilir. Bu zararlı maddeler kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanları içermektedir (Ren et al., 2017). Genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA kırıkları, DNA insersiyonları, kromozom anormalileri, gen mutasyonları, klastojenite ve anöploidi gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. DNA'da mutasyona neden olan ajanlar, DNA'ya doğrudan veya genomik bilgilere göre sentezlenmiş proteinlere bağlanarak dolaylı olarak etkilerini gösterirler. DNA hasarında rol oynayan kilit moleküllerinde ve sinyal yollarında meydana gelen bozukluklar doku hasarı, kanser, yaşlanma, kısırlık ve bazı genetik ve çok faktörlü hastalıklara neden olur (Şekil 1.6) (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011). Genetik toksikoloji, hücrenin DNA'sına ve kromozomlarına zarar verebilecek ajan veya maddelerin incelenmesiyle ilgilenen bilim dalıdır. Genellikle genotoksisitenin mutajenite ile karıştırıldığı belirtilmektedir (SAKS et al., 2017). Genotoksisite, mutajenisiteyi kapsar, ancak tüm genotoksik maddeler, DNA dizilerinde genetik değişikliklere neden olmayabileceklerinden dolayı mutajenik değildir (Ren et al., 2017).

Ateroskleroz, otoimmün hastalıklar ve bazı diyabet türleri dahil olmak üzere birçok önemli hastalık mutasyonlarla ilişkilendirilmektedir. Ek olarak, epidemiyolojik çalışmalar, birçok kanserin kalıtsal bir mutator fenotipinin yanı sıra çoklu mutasyon etiyojisine bağlı olduğunu göstermiştir (Knezevic-Vukcevic et al., 2007). Son yıllar, çok çeşitli tıbbi bitkiler ve bunların metabolitleri, zararlı kimyasalların mutajenik ve kanserojenik etkilerini azaltma potansiyelleri açısından incelenmektedir. Çünkü bu doğal bileşikler serbest radikalleri ve oksidatif stresin neden olduğu DNA ve hücre hasarları inhibe edebilme potansiyeline sahiptirler (Bouguellid et al., 2020).



Şekil 1.6: Genotoksinlerin Etki Mekanizması ve Sonuçları (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).

1.5.1 Genotoksisite Testleri

Günümüzde rutin olarak kullanılan genotoksisite yöntemleri son 30 yılda geliştirilmiştir. Bu sürede çok sayıda test geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Cakmak Demircigil et al., 2009) Bu testler, çeşitli mekanizmalarla genetik materyale doğrudan veya dolaylı olarak verilen hasarı tespit etmek için geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerden oluşmaktadır (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011). Bu çalışmada yer alan genotoksisite testleri mikronükleus testi ve 8-OHdG ELISA testidir.

1.5.1.1 Mikronükleus Testi

Hücreler bir genotoksik ajana maruz bırakıldığında mikronükleus yapılar oluşabilmektedir. Mikronükleuslar kromozomda meydana gelen kırıklar nedeniyle, asentrik kromozom parçacıkları veya mitotik ağ aparatındaki hataların sonucunda, telofazda kutuplara

çekilemeyen kromozomlardır ve sitoplazmada gözlenen esas çekirdeğe dahil olmayan küçük çekirdek yapılarıdır (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011; Yüzbaşıoğlu et al., 2014). Mikronükleus sayısındaki artış, çeşitli ajanların neden olduğu hücrelerdeki kromozomal düzensizliklerin ve somatik hücrelerdeki genomik instabilitenin dolaylı bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).

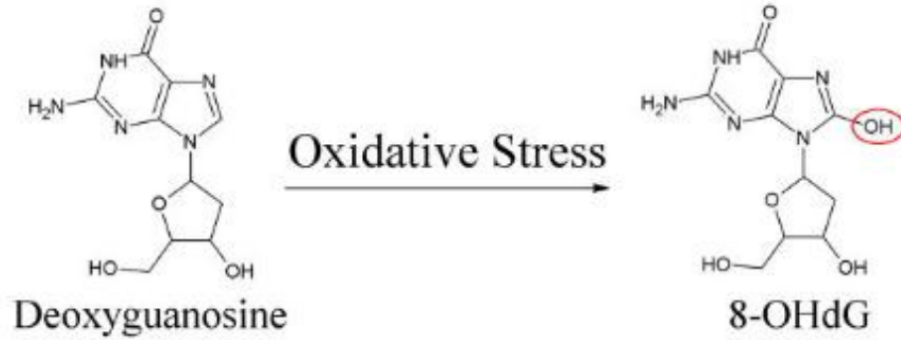
Mikronükleus testi sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi olarak da adlandırılır ve kimyasal ya da fiziksel ajanların kromozomlar üzerindeki genotoksik etkilerini değerlendirmesinde kullanılan yöntemlerden biridir. Mikronükleus yapılarını saptayabilmek için bu yöntemde sitokinez durdurulmalıdır. Bu amaçla bir aktin polimeraz inhibitörü olan sitokalasin B (CytB) kullanılır ve belirlenen inkübasyon süresi sonunda protokollere uygun şekilde hasat edilen mitotik hücrelerin binükleer görüntüleri elde edilir (Yüzbaşıoğlu et al., 2014).

1.5.1.2 8-OHdG ELISA Testi

Nükleik asitlerin oksidatif hasarları, biyomoleküller arasında gözlenen en tehlikeli modifikasyonlardır. Bu hasarlar bazların ve/veya şeker parçalarının oksidasyonu, tek/çift zincir kırılmaları, bazik/apuridik/apirimidinik bölgelerin oluşması ve pürin/pirimidin/şeker bölgelerindeki modifikasyonlar, nükleik bazların yapısal mutasyonları, DNA-protein çapraz bağlanmaları, kromozom parçalarının delesyonları ve/veya translokasyonları olarak gözlenebilmektedir. Bu tür hasarların birikmesi, genetik bilgide değişikliklere ve sonuç olarak mutajenez ve hücre apoptozisine yol açabilir. Hidroksil radikali, DNA hasarlarının çoğundan sorumludur. Pirimidinlerin C5 karbon atomuna veya metil grubunun (CH₃) karbon atomuna saldırırken, pürinlerin C8 atomuna veya adeninlerin amino grubuna saldırabilir. Tüm nükleik bazlardan guanozin, ROS'un neden olduğu oksidatif strese en duyarlı olanıdır (Urbaniak et al., 2020).

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), oksidatif stresin biyolojik belirteci olarak bilinmektedir. 8-OHdG, hücresel DNA'da 2'-deoksiguanozinin oksidasyonu ile üretilir (Inaba et al., 2011). 8-OHdG'nin modifikasyonu, •OH veya ¹O₂ ile DNA zincirinin guanozinin arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Serbest radikaller,

guanozine veya serbest 2'-deoksiguanozine saldırır, bu da sonuç olarak radikal eklentiler oluşturur (Şekil 1.7) (Urbaniak et al., 2020). 8-OHdG konsantrasyonu ile ilgili yapılan araştırmalar incelendiğinde bağırsak kanseri, diyabet veya Alzheimer hastalarında 8-OHdG miktarında bir artış olduğu bilinmektedir. Ayrıca yaşlanma ve farklı toksik ajanlara maruz kalma gibi durumlarda da 8-OHdG miktarında artış gözlemlenmiştir (Inaba et al., 2011). Bu nedenle 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının en sık kullanılan biyolojik belirteçlerindendir (Martins et al., 2017). Oksidatif DNA hasarı ELISA kiti (Oxiselect™, Cell Biolabs STA-320, San Diego, ABD) oksidatif DNA hasarını belirlemek için kullanılmaktadır. Bu test, DNA ekstraksiyonu, DNA sindirimi ve 8-OHdG tespit etme olmak üzere üç ana basamaktan oluşmaktadır (Uğur Aydın et al., 2018).



Şekil 1.7: 8-OHdG oluşumu (Handayani et al., 2017).

1.6 Antibakteriyel Aktivite

Bakteri, mantar ve maya gibi mikrobiyal türler dünyanın hemen her yerinde yaşayabilirler ve bazıları insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde klinik olarak anlamlı hastalıklara sebep olan birincil ve fırsatçı patojenler olabilmektedirler. 1900'lü yılların başlarında, bulaşıcı hastalıklar dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biri olsa da geçen yüzyılda, yüksek ölüm sayısına sebep olan mikrobiyal enfeksiyonlar, antibiyotikler, antiseptikler, dezenfektanlar gibi antimikrobiyal ajanların gelişmesiyle anlamlı ölçüde azalmıştır. (Ustaoğlu Iyigünoğdu et al., 2014). Antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı bakteri ve mantar kaynaklı antibiyotiklere güvenildiği için yüksek bitkilerin çok azı antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılmaktadır. 1950'lerde antibiyotiklerin ortaya çıkışından bu yana, bitki türevlerinin antimikrobiyal olarak kullanımı azalmıştır (Cowan, 1999). Ancak tıbbi açıdan

önemli bakterilerde antibiyotik direncinin endişe verici sıklığı göz önüne alındığında, bilim adamlarının yeni antimikrobiyal madde araştırma çalışmaları yoğunluk kazanmıştır. Bulaşıcı hastalıkların tedavisi için tıbbi bitkilerin alternatif antimikrobiyal ilaçlar olarak geliştirilmesine sürekli ihtiyaç vardır (Parekh et al., 2005).

1.6.1 Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi, bakterilerin antibakteriyel maddelere karşı olan duyarlılığını test etmek için kullanılan temel bir yöntemdir ve seçilmiş bir bakteri soyunun inoküle edildiği agar besiyeri üzerine araştırılacak olan antibakteriyel maddeyi içeren disklerin yerleştirilmesi prensibine dayanmaktadır (Pavlasova, 2015).

1.7 Hemouyumluluk

Kan, plazma ve hücrelerden meydana gelen kompleks bir dokudur. Kan plazması, nispeten yüksek protein içeriğine (40-60 g / L) sahip, %0.9 sodyum klorüre karşılık gelen izotonik bir elektrolit çözeltisidir. Kanda bulunan en yaygın kan hücreleri eritrositlerdir. 1 µL kanda 4 milyon eritrosit bulunmaktadır, bu ise toplam kan hacminin %40'ının eritrositler tarafından oluşturulduğu anlamına gelmektedir. Bu hücreler ayrıca en rijit olan hücrelerdir ve yırtılmaya ve ardından ortaya çıkan hemolize eğilimlidirler (Sanak et al., 2010). Latince hemo (kan) ve lizis (parçalanmak) kelimelerinden oluşan hemoliz, eritrositlerin hücre zarının hasar görmesi veya tahrip edilmesinden sonra hemoglobinin ve diğer hücre içi bileşenlerin çevreleyen plazmaya salınmasıdır (Lippi et al., 2008). Hemoliz, ozmotik basınçtaki bir değişiklik veya mekanik cihazlarla etkileşim ile de ortaya çıkabilmektedir (Sanak et al., 2010). Kan bileşenlerindeki hemoliz miktarı, hücresel bütünlüğün önemli bir göstergesi ve kalite parametresidir (Sawant et al., 2007). Hemouyumluluk terimi, materyallerin kan ve kan bileşenleri ile uyumluluğunu değerlendirmek anlamına gelmektedir (Sastri, 2022). Hemouyumluluk testleri, kanla temas eden tıbbi cihaz veya materyallerin kan ve/veya kan bileşenleri üzerindeki etkilerini değerlendirir (Anderson, 2012).

Hemolitik *in vitro* aktiviteler, ilaç geliştirmelerinde yeni bir araştırma alanına dönüşmektedir. Araştırmacılar, anti-agregasyon etkileri olan potansiyel doğal ürünleri

bulmak için etnobotanik açıdan önemli bitkileri incelemektedirler. Bu çalışmalar önemlidir, çünkü bazı hastalar var olan ilaca karşı dirençli hale gelmişlerdir (Mukherjee & Rajasekaran, 2010). Hemolitik aktivitesinin ölçülmesi, sitotoksitenin bir göstergesi olduğu için, bitki ekstraktların insan kanı üzerindeki etkisinin araştırılması önemlidir (Mukherjee & Rajasekaran, 2010; Oliveira et al., 2009).

1.8 Literatür Özeti

Literatüre bakıldığında *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisi üzerinde üç uluslararası çalışma yapıldığı görülmektedir. Bu çalışmaların birinde Ulukanlı ve Akkaya *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin hekzan, aseton ve metanol ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini incelemek için disk difüzyon yöntemini kullanmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmaların sonunda bitkinin heksan ekstraktının çeşitli düzeylerde antibakteriyel aktivite gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır (Ulukanlı & Akkaya, 2011). Özcelik ve arkadaşları, *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin petrol eteri ve metanol ekstraktlarında antiviral, antibakteriyel ve antifungal etkilerini araştırmışlardır. Her numunenin antiviral, antibakteriyel ve antifungal etkilerinin belirlenmesi için maksimum toksik olmayan konsantrasyonu (MNTC) hücrel morfolojik değişikliklere dayalı olarak incelenmiştir ve *Phlomis pungens* var. *hirta* ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal atkivitesi gösterdiğini ancak antiviral aktivite göstermediği sonucuna ulaşılmıştır (Özcelik et al., 2010). Özkan ve arkadaşları *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin yaprak ve çiçek metanolik ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini test etmişlerdir ve bitki ekstraktlarının özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis*'e karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Özkan et al., 2009).

Phlomis pungens var. *hirta* bitkisinin bir üyesi olduğu Lamiaceae familyasındaki diğer bitkilere ait literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Çeker ve arkadaşları Lamiaceae familyasına ait olan *Origanum vulgare* bitkisinin esansiyel yağının kimyasal bileşimini, *in vitro* antijenotoksik etkilerini ve antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Bu amaçla aflatoksin B1 ile inkübe edilmiş insan lenfosit hücreleri kullanılarak antijenotoksik aktivite, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testleri ile değerlendirilmiştir. Deneylein sonucunda, *Origanum vulgare* bitkisinin güçlü antioksidatif ve antijenotoksik etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Ceker et al., 2012). Dirican ve arkadaşları da

Thymbra spicata L. bitkisinin su, metanol ve etanol ekstraktların cıva ile indüklenmiş insan lenfositleri üzerindeki antijenotoksik etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, bu çalışmanın sonucunda, *Thymbra spicata*'nın, ağır metal kaynaklı genotoksisitenin bir baskılayıcısı olarak kullanılabilir toksik olmayan bir malzeme olduğunu göstermişlerdir (Dirican et al., 2012). Daradka ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, yedi Suudi şifalı bitkisinin oksidatif DNA hasarına karşı potansiyelleri insan lenfosit hücreleri ile 8-OHdG testi kullanılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak, *Nigella sativa*, *Olea chrysohylla* ve *Pulicaria cripa* bitkilerinden elde edilen özütlerin, kültürlenmiş hücrelerde oksidatif DNA hasarını önlemek için yararlı ajanlar olarak kullanılabilirliği rapor edilmiştir (Daradka et al., 2018). Alkofahi ve arkadaşları Ürdün'de yetişen ve yüksek antioksidatif kapasiteye sahip olduğu bilinen bazı bitkiler ile hazırlanan ekstraktların insan lenfositlerindeki oksidatif DNA hasarına karşı olan koruyucu etkilerini *in vitro* 8-OHdG testi kullanarak test etmişlerdir. Araştırılan 15 bitki arasında Lamiaceae ailesine ait olan *Salvia triloba* bitkisinin yaprak kısımlarının etanol ekstraktının oksidatif DNA hasarına karşı en koruyucu özelliklere sahip olan bitki olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Alkofahi et al., 2016).

Ehtesham-Gharaee ve arkadaşları *Scutellaria lindbergii* (Lamiaceae) bitkisinin metanol ekstraktının H₂O₂ ile indüklenmiş NIH 3T3 hücre hatı üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisini araştırmışlardır. Çalışmada sitotoksisite MTT testi ve genotoksisite Comet testi ile saptanmıştır ve deney sonucunda *Scutellaria lindbergii*'nin DNA hasarı üzerinde önemli inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir (Ehtesham-Gharaee et al., 2015). Hartiadi ve arkadaşları *Caesalpinia sappan* L. bitkisinin metanol ekstraktının H₂O₂ ile indüklenmiş insan keratinosit hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve antioksidan etkisini MTS testi ile araştırmışlardır. Çalışmaların sonucunda, *Caesalpinia sappan* L. bitkisinin oksidatif strese karşı E vitamini ile karşılaştırılabilir bir koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Hartiadi & Sahamastuti, 2020). Mahomoodally ve arkadaşları *Ocimum tenuiflorum* (Lamiaceae) bitkisinin metanol ve su ekstraktların 3T3 hücre hatı üzerindeki antioksidan ve sitotoksik etkisini MTT testini kullanarak araştırmışlardır ve sonuçlarında bitkinin güçlü antioksidan performans göstermiş olduğunu belirlemişlerdir (Mahomoodally et al., 2012).

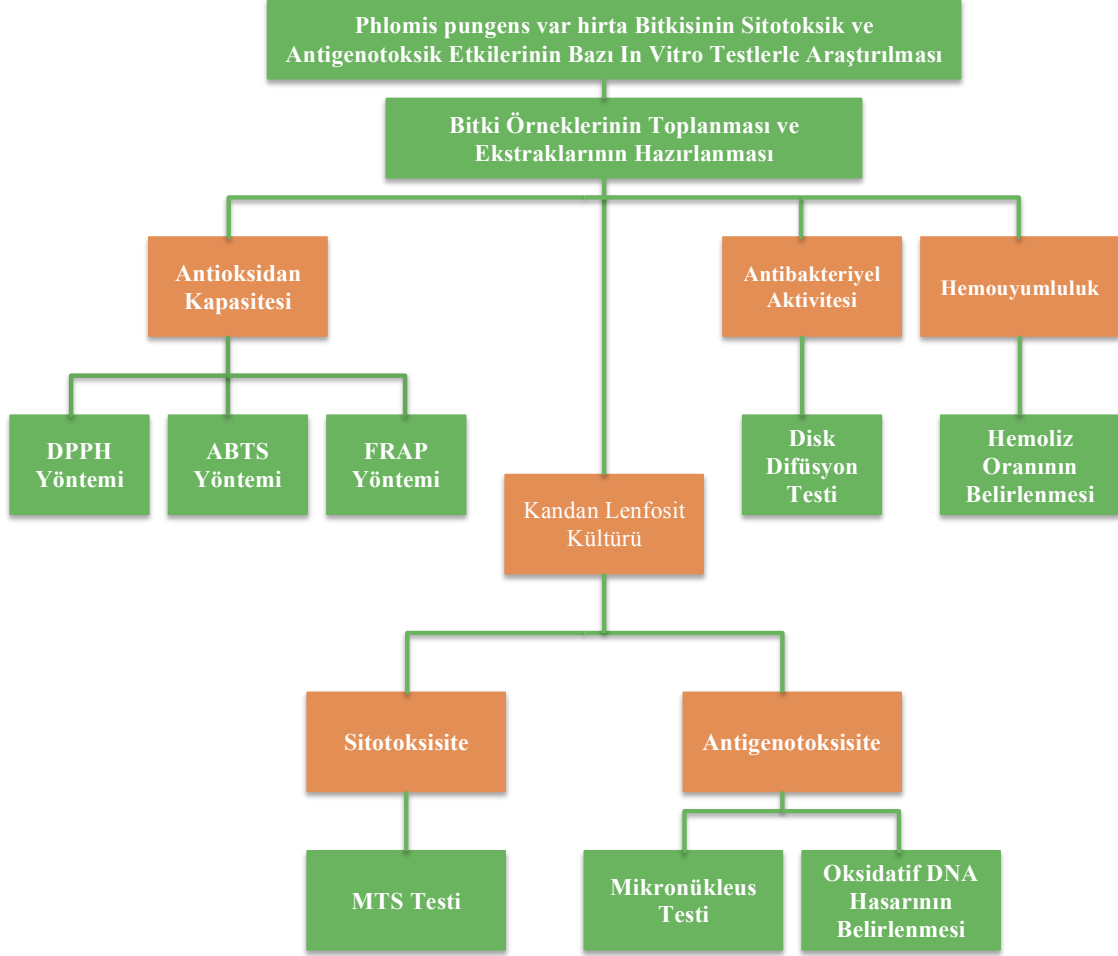
Firuzi ve arkadaşları İran'da yetişen 9 *Salvia* türü ve 15 diğer Lamiaceae bitkisinin metanolik ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini, FRAP ve DPPH serbest radikal

süpürme deneyleri kullanarak değerlendirmişlerdir. DPPH testindeki IC₅₀ değerleri 115.7-1350.2 µg kuru ağırlık/mL olarak belirlenmiştir ve *Salvia* türleri en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir (Firuzi et al., 2010). Gougoulas ve Mashev Yunanistan ve Bulgaristan'da yetişen ve bitki çaylarının hazırlanmasında kullanılan Lamiaceae familyasına ait on şifalı bitkiyi, polifenol içerikleri ve antioksidan aktiviteleri açısından incelenmişlerdir. Araştırmacılar antiradikal aktiviteleri, DPPH testi sonucunda 6.05- 9.95 µmol Trolox/g dw ve ABTS testi sonucunda da 13.07- 18.30 µmol Trolox/g dw olarak bulmuşlardır. Çalışılan bitkiler karşılaştırıldığında, kekiğin en yüksek polifenol içeriğine ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenirken, fesleğenin en düşük değerlere sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu araştırma sonunda araştırmacılar, çayların içerdikleri antioksidan fenolikler sayesinde yüksek serbest radikal temizleme potansiyellerinin olduğunu ve önemli diyet kaynakları olarak kabul edilmeleri gerektiğini belirtmişlerdir (Gougoulas & Mashev, 2015).

1.9 Çalışmanın Amacı

Son yıllarda modern tıpta gözlemlenen büyük ilerlemelere rağmen, bitkiler hala sağlık hizmetlerine önemli bir katkıda bulunmaktadır. Şifalı bitkilere olan ilgi, özellikle gelişmekte olan ülkelerde halk ilaçlarında uzun süre kullanılmalarından ve profilaktik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Çoğu tıbbi bitkinin toksisite profili kapsamlı bir şekilde değerlendirilmemiş olsa da, genellikle bitki ürünlerinden elde edilen ilaçların sentetik muadillerine göre daha güvenli olduğu kabul edilmektedir (Saeed et al., 2012).

Lamiaceae ailesinin üyesi olan *Phlomis pungens* var. *hirta* türünün su, metanol ve etanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesi, insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve H₂O₂'in indüklemiş olduğu mutajenik etkiyi ne kadar baskıladığı belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca, *Phlomis* türün çeşitli bakteri türleri üzerindeki antibakteriyel aktivitesi ve hemouyumluluğu belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 1.8). Bu araştırma kapsamında elde edilen bulguların literatüre sağlayacağı önemli katkılarının yanı sıra, oksidatif DNA hasarlarına karşı *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinden faydalanılarak sentezlenebilecek potansiyel farmakolojik ürünlerin tasarımı için önemli bir kaynak oluşturacağını düşünmekteyiz.



Şekil 1.8: Tez kapsamını özetleyen diyagram.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Deneysel Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal ve Laboratuvar Malzemeleri

Kullanılacak kimyasalların güvenlik protokolleri deney öncesinde incelenmiş ve sağlığa zararları dikkate alınarak hazırlıklar yapılmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve laboratuvar malzemeleri Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Kimyasal ve laboratuvar malzemeleri listesi.

Bitki Ekstraktların Hazırlanması İçin Kullanılan Malzemeler
dH ₂ O
Metanol
Etanol
Filtre kağıdı

Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Malzemeler
DPPH çözeltisi
Metanol
ABTS çözeltisi
Amonyum persulfat
FRAP çözeltisi

Kandan Lenfosit Kültürünün Oluşturulması İçin Kullanılan Malzemeler
RPMI
FBS
Penisilin/Streptomisin
Phetohemaglutinin
H ₂ O ₂

MTS Testi İçin Kullanılan Malzemeler
MTS reagent

Mikronükleus Testi İçin Kullanılan Malzemeler

Cyt-B
KCl
Metanol
Glasiyel asetik asit
Formaldehit
Etanol
Giemsa
Sorrenson tamponu
Filtre kağıdı
Şale
Lam
dH₂O

Oksidatif DNA Hasarının Belirlenmesi İçin Kullanılan Malzemeler

DNA ekstraksiyon kiti	Monarch®Genomic DNA Purification Kit
PBS	
Proteinaz K	
RNaz A	
Hücre Lizis Tamponu	
gDNA Bağlanma Tamponu	
gDNA Saflaştırma Tamponu	
gDNA Yıkama Tamponu	
gDNA Elüsyon Tamponu	
Nükleaz P1	
Oksidatif DNA hasarı ELISA kiti	Oxiselect™, Cell Biolabs STA-320
ELISA plakası	
8-OHdG konjüгатı	
Anti-8-OhdG Antikoru	
Yıkama Tamponu	
İkincil antikoru-enzim konjüгатı	

2.1.2 Deneysel Çalışmalarında Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Deneysel prosedürlerin uygulanması sırasında çeşitli laboratuvar cihazlarından yararlanılmıştır. Kullanılan laboratuvar cihazları Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları.

Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Cihazları	
Biyogüvenlik kabini	Labconco
Etüv	Memmert
CO ₂ ’li İnkübatör	Nuaire
Mikropipet seti	Eppendorf
pH metre	Hanna Instruments
Hassas terazi	Denver Instrument
Saf su cihazı	Human Power I
Manyetik karıştırıcı	Heidolph
Soğutmalı santrifüj	Hettich Rotina 380R
Çalkalamalı inkübatör	Gerhardt
Evaporatör	Heidolph
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Thermo Scientific
Su banyosu	Elma Sonic
Işık mikroskobu	Olympus
Vorteks	Warning
µDrop™ Plate	Thermo Fisher Scientific
Otoklav	Hirayama
Buzdolabı (-20 °C) (+4 °C)	Altus
Buzdolabı (+4 °C)	Regal

2.2 Metot

2.2.1 Bitki Örneklerinin Toplanması ve Ekstraktlarının Hazırlanması

2.2.1.1 Bitki Materyallerinin Temini

Phlomis pungens var. *hirta* bitkisinin toprak üstü olan kısımları, Haziran 2020’de Diyarbakır’ın (Türkiye) Lice ve Kulp ilçeleri arasında yaklaşık 1100 m yükseklikte çiçeklenme döneminde toplanmıştır. *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisi Dr. Öğretim Üyesi

Mikail Acar tarafından toplanmış ve teşhis edilmiştir.

2.2.1.2 Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Bitki, hava akımı olan gölge bir alanda kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Yaprak ve çiçek kısmı (50 gr) 250 mL su, metanol ve etanola maruz bırakılmıştır ve gece boyunca çalkalayıcıda tutulmuştur. Elde edilen bitki ekstraktı filtre kağıdı ile süzölmüştür. Öz, bir evaporatör kullanılarak vakumda konsantre edilmiş ve test edilinceye kadar 4 °C'de saklanmıştır (Dirican et al., 2012).

2.2.2 Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

2.2.2.1 DPPH Yöntemi

Phlomis pungens var. *hirta* türün antioksidan kapasitesi, DPPH radikal süpürme aktivitesi kullanılarak belirlenmiştir. DPPH tartılmıştır ve metanol içeren bir balonda çözdürölmüştür. 0,05 mL bitki ekstraktı, 2,5 mL DPPH ve 2,5 mL metanol bir test tüpüne ekleyip 1 saat karanlıkta tutulmuştur. Spektrofotometrik ölçümler 517 nm'de yapılmış ve numunelerin radikal süpürme aktivitesi belirlenmiştir (Yıldız et al., 2020).

2.2.2.2 ABTS Yöntemi

Phlomis pungens var. *hirta* türün ABTS radikal süpürme aktivitesi, Re ve ark.'nın yöntemi ile yapılmıştır. ABTS çözeltisi, eşit hacimlerde ABTS tuzu ve amonyum persülfat kullanılarak hazırlanmış ve gece boyunca karanlıkta tutulmuştur. Numune analizi için, 2,95 mL ABTS çözeltisi ve 0,05 mL numune (bitki ekstraktı) 3 mL'lik bir küvete eklenmiştir. Ölçümler 734 nm'de UV-Görünür bir spektrofotometre ile yapılmıştır (Yıldız et al., 2020).

2.2.2.3 FRAP Yöntemi

Phlomis pungens var. *hirta* türün demir iyonu indirgenme gücü FRAP metodu ile belirlenmiştir. 10 mM 25 mL asetat tamponu ve 300 mM (pH 3,6) 2,5 mL 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) çözeltisi 40 mM HCl ve 20 mM FeCl₃6H₂O içine karıştırılarak son hacim 2,5 mL olacak şekilde taze bir FRAP çözelti hazırlanmıştır. Karışık çözelti 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bir numune (150 µL), 2850 µL FRAP çözeltisi ile karıştırılmış

ve 30 dakika boyunca karanlıkta tutulmuştur. Demirli tripiridiltriazin kompleksinin absorbansı 593 nm’de ölçülmüştür. Standart eğri, 50 ila 500 µM arasında değişen Trolox eşdeğerliğinde hazırlanarak kullanılmıştır (Büyüktünel, 2013).

2.2.3 Kandan Lenfosit Kültürünün Oluşturulması

Projede kullanılmış olan lenfosit hücreleri için kan; kronik hastalığı olmayan, sigara kullanmayan, yakın zamanda ilaç kullanmamış ve en az 6 ay içinde enfeksiyon hastalık geçirmemiş olan sağlıklı gönüllü bireylerden heparinli tüplere alınmıştır. Bu çalışma kapsamında 25-30 yaş arası 2 erkek ve 2 kadın toplamda 4 gönüllü birey kullanılmıştır. Deneyde kullanılan besiyerini hazırlamadan önce -20 °C de tutulan Penisilin/Streptomisin ve FBS 37 °C’de ultrasonik su banyosunda eritilmiştir. Hücre besiyeri hazırlanmasında, lenfositler için büyüme faktörü içeren 100 mL FBS 77,5 mL RPMI 1640 mediumun içine ilave edilmiştir. Kontaminasyonları önlemek için 0,5 mL Penisilin/Streptomisin ve hücrelerin bölünmesini teşvik etmek için 1 mL Phtohemaglutinin besiyerine eklenmiştir. Elde edilen besin ortamı falkonlara bölünerek 5 mL kültür ortamları hazırlanmıştır (pH’ları 6,8-7,2) ve -20 °C de saklanmıştır. Hazırlanan kültür ortamlarına yaklaşık 0,5 mL kan ekilmiş ve 37 °C’lik etüvde 72 saatlik kültüre alınmıştır. Antigenotoksinite testleri için çalışılan olan *Phlomis pungens* var. *hirta* ekstraktları (0.10, 0.25, 0.50, 1, 10, 25, 50, 100 mg/L) inkübasyonun 48.saatinde kültür ortamlarına katılmıştır. Pozitif kontrol olarak H₂O₂ (6,5 µg/mL) kültür ortamına eklenmiştir. Bu çalışma Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 23.06.2021 tarihli 2021/132 no’lu karar ile onaylanmıştır.

2.2.4 Sitotoksitenin Belirlenmesi

2.2.4.1 MTS Testi

0.1 mg/L, 0.25 mg/L, 0.50 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonlarda hazırlanmış olan bitki ekstraktları yeni izole edilen lenfositler ile etkileştirilmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan lenfosit kültürün içine herhangi bir bitki ekstraktı eklenmemiştir. Tüm numuneler ve kontrol grupları üç gün boyunca 37 °C’de % 5’lik CO₂ ortamına inkübe edilmiştir. 24 ve 48’lik inkübasyon süreçlerinin sonunda 96-Well Plate’in her bir kuyucuğa 100 µL lenfosit hücreleri eklenmiştir ve üzerlerine 20 µL MTS

çözeltisi eklenip dört saat boyunca inkübe edilmiştir. Spektrofotometre ile 490 nm'de ölçüm alınmıştır (Yılmaz et al., 2019).

2.2.5 Genotoksisitenin Belirlenmesi

2.2.5.1 Mikronükleus Testi

Binükleuslu hücreler elde etme amacıyla kültür süresinin 44. saatin başında hücre bölünmesini sitokinez aşamasında durduran final konsantrasyonu 3µg/mL olan sitokalazin-B (Cyt-B) kültür ortamına ilave edilmiştir. 48. saatte bitki ekstraktları eklenerek ve 72. saatte hücreler rutin hücre kültürü yöntemine göre toplanarak 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve çöken kısımdaki hücrelerin şişmesi ve ışık mikroskopunun altında mikronükleusların görülebilmesi için belirlenen sürede 0,075 M KCl hipotonik solüsyonu ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda tekrar 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edilerek hücreler çökertilmiştir. Ardından taze hazırlanmış 3:1 oranında metanol ve glasiyel asetik asit içeren soğuk fiksatifle kültür ortamı yavaş yavaş 7 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen hücreleri sabitlemek için kültür ortamına 1-2 damla formaldehit ilave edilmiştir. Yaklaşık 5 dakikalık fiksasyon süresinin ardından 5 dakika 800 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Dipteki pelletin yoğunluğuna dikkat edilerek 1 ml'ye kadar daha fiksatif eklenmiştir. Bu aşamada fiksatif içerisindeki hücreler artık lamlara yayılarak preparat haline gelip son şekillerini almıştır. Elde edilen hücreler alkolde temizlenmiş lamlar üzerine yayılarak kurumaya bırakılmıştır. 5 mL Giemsa üzerine 95 mL Sorrensen tampon çözeltisi ilave edip filtre kağıdında süzülerek şaleye koyulmuştur. Kurutulan preparatlar %5'lik Giemsa solüsyonu ile şale içerisinde 15 dakika boyanmış ve süre sonunda preparatlar distile suyla durulanarak havada kurutulmuş ve serin bir yerde muhafaza edilmiştir. Işık mikroskobu ile 40X objektif ayarlanmış ve hazırlanan preparatlarda 2000 binükleer (iki nükleuslu) hücre incelenmiştir. Bu binükleer hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptanmıştır (Dirican et al., 2012).

2.2.5.2 Oksidatif DNA Hasarının Belirlenmesi

Oksidatif DNA hasarı ELISA kiti (Oxiselect™, Cell Biolabs STA-320, San Diego, ABD) oksidatif DNA hasarını belirlemek için kullanılmıştır. Bu test, DNA ekstraksiyonu, DNA sindirimi ve 8-OHdG tespit etme olmak üzere üç ana basamaktan oluşmaktadır.

DNA Ekstraksiyonu

DNA, DNA ekstraksiyon kiti (Monarch® Genomic DNA Purification Kit) kullanılarak su, metanol ve etanol ekstraktlarına (50 mg/mL) 24 saat boyunca maruz bırakılan lenfosit hücrelerinden izole edilmiştir. Bunun için 1×10^4 - 5×10^6 hücre içeren bir hücre pelleti 1.000 x g'de santrifüj edip 100 µL soğuk PBS de çözülmüştür. Üzerine 1 µL Proteinaz K ve 3 µL RNaz A ekleyip vorteks ederek karıştırılmıştır. 100 µL Hücre Lizis Tamponu ekleyip tekrar vorteks edilmiş ve 1400 rpm'de termal çalkalayıcıda 56 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Numuneye 400 µL gDNA Bağlama Tamponu ekleyip 5-10 saniye boyunca vorteks ederek karıştırılmıştır. Lizat / bağlama tamponu karışımını (~ 600 µl) bir toplama tüpüne önceden yerleştirilmiş bir gDNA Saflaştırma Kolona aktarılmıştır. Daha sonra gDNA'yı bağlamak için ilk önce 3 dakika 1.000 x g'de ve ardından membranı temizlemek için maksimum hızda ($> 12.000 \times g$) 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir toplama tübüne aktarılmıştır. 500 µL gDNA Yıkama Tamponu ekleyip bir kaç kez alt üst edilerek ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır. gDNA Saflaştırma Kolonunu DNaz içermeyen 1,5 mL mikrofüj tüpüne yerleştirilmiş ve 35-100 µL önceden ısıtılmış (60 °C) gDNA Elüsyon Tamponu ekleyip, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. gDNA'yı elüe etmek için maksimum hızda ($> 12.000 \times g$) 1 dakika santrifüj edilmiştir.

DNA Saflığının Ölçümü ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Nükleik asitlerin konsantrasyonu bir köre (boş örnek) karşı 260 nm de absorbans ölçülerek belirlenmiştir. DNA saflığının ölçümü ve konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla µDrop™ Plate cihazı mikrolitre bazında sonuçlar için kullanılmıştır. Microdrop cihazına 2 µL'lik DNA örneği direk seyreltilmeden konulmuştur. Kontaminantların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt edilmiştir. Proteinler 280 nm de absorbladığı için A260/A280 oranı nükleik asitin saflığını hesaplamak için kullanılmıştır. Saf DNA yaklaşık 1.8, saf RNA ise yaklaşık 2.0 değerini vermelidir.

Konsantrasyon hesabı yapılırken şu formül kullanılmıştır:

$$\text{DNA konsantrasyonu}(\mu\text{g/mL}) = \text{Abs}_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times (10 \text{ mm}/0,49 \text{ mm})$$

DNA Sindirimi

İzole edilen DNA örnekleri, 95 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde hızlı soğutma ile tek sarmallı DNA'ya dönüştürülmüştür. Daha sonra, 100 µL DNA'ya 10 µL Nükleaz P1 eklenmiştir. Örnekler, DNA'yı hidrolize etmek için 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiş ve her hidrolize DNA örneğine alkalın fosfataz (10 µL) ekleyip 37 °C'de 1 saat daha inkübe edilmiştir. Tüm safsızlıkları gidermek için hidrolizatlar süzölmüş ve 5 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

8-OHdG Tespit Etme

8-OHdG ELISA testi, tedarikçinin talimatları izlenerek gerçekleştirilmiştir. Özet olarak, ELISA plakası, 8-OHdG konjugatı (her bir oyuğa 100 µL 1 µg/mL) ile kaplanmıştır ve 4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Kaplanmış kuyucuklar 200 µL tahlil seyrelticileri ile yıkanmıştır ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında tahlil seyrelticisi ile bloke edilmiştir. Bilinmeyen numuneler (50 µL) ve sağlanan 8-OHdG standartları (0 ila 20 ng/mL arasında değişen) benzer kaplanmış oyuklara eklenmiş ve bir orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, her kuyuya 50 µL anti-8-OHdG antikoru ilave edilmiş ve 1 saat boyunca orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında tekrar inkübe edilmiştir. Mikrokuyu stripleri, her yıkama arasında aspirasyonun doğru şekilde gerçekleşmesini sağlamak için çukur başına 250 µL Yıkama Tamponu (1X) ile üç kez yıkanmıştır. Kuyular, tüm yıkama döngülerinden sonra Yıkama Tamponunu uzaklaştırmak için bir kağıt havluya ters koyarak temizlenmiştir. İkincil antikor-enzim konjugatı (100 µL) eklenmiş ve 1 saat inkübe edilmiştir. Yıkama Tamponu ile tekrar üç kez yıkandıktan sonra, her tampona 100 µL substrat ilave edilmiş ve renk oluşumu gözlemlenene kadar 2 ila 30 dakika inkübe edilmiştir. Renk fiksasyonu geliştirildikten sonra, 100 µL durdurma çözeltisi eklenmiş ve absorbans, 96 oyuklu bir ELISA plaka okuyucusunda (Thermo Scientific Multiskan GO) 450 nm'de ölçölmüştür (Uğur Aydın et al., 2018).

2.2.6 Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi

Antibakteriyel aktivitesi tayini disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Hazır besiyeri olan triptik soy agar ve dört gram negatif bakteri türleri olan *Aeromonas* spp. (ATCC-51107), *Escherichia coli* (ATCC-8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-9027), ve *Enterobacter aerogenes* (ATCC-13048) ve bir gram pozitif bakteri türü olan *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538) kullanılmıştır. Stok kültürler 150 µL besiyerlerine ekim yapılmış ve gece

boyunca 37 °C’de inkübe edilmiştir. 24 saat boyunca %75’lik etanol ekstraktında bekletilen diskler bakteri kültürlerine bırakılmış ve tekrar gece boyunca inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak Gentamisin kullanılmıştır. Disklerin çevresindeki zon çapları mm biriminde ölçülerek ekstraktların inhibisyon zonları belirlenmiştir (Basile et al., 2006).

2.2.7 Hemouyumluluk Testi

Hemoliz oranının belirlenmesi için Motlagh ve arkadaşlarının yöntemi (2006) uygulanarak yapılmıştır (Motlagh et al., 2006). Bitki örneği toz haline getirip 0,01 gr tartılmıştır. 200 µL EDTA’lı kan 10 ml %0,9 NaCl çözeltisinde seyreltilmiştir. Bitki tozu içeren her bir eppendorf tüpüne 1000 µL seyreltik kan alınmıştır. Pozitif kontrol olarak 200 µL antikogülantlı kan 10 ml dH₂O’da çözülüp içerisinden 1 mL alınarak boş bir eppendorf tüpüne eklenmiştir. Negatif kontrol grubu için NaCl çözeltisi ile seyreltilmiş kandan 1 mL alınmış ve içine bitki tozu konulmamıştır. Hazırlanmış tüpler 2 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında bitki tozu tüplerden uzaklaştırılmış ve 1000 x g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımlardan 200 µL alınarak 96-Well Plate’in kuyucuklarına eklenmiş ve spektrofotometre kullanarak 545 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır.

% Hemoliz oranı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Hemoliz} = \frac{[\text{Absorbans}_{\text{Test polimeri}} - \text{Absorbans}_{\text{Negatif Kontrol}}]}{[\text{Absorbans}_{\text{Pozitif Kontrol}}]} \times 100$$

2.2.8 İstatistik

Deney sonuçları için standart hata en az n=3 biyolojik tekrar için hesaplanmış olup, p değerleri *t*-Test ile Microsoft Office Excel kullanılarak hesaplanmıştır. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Bu çalışmada *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin su, metanol ve etanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesi, lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, H₂O₂ ile indüklenmiş lenfosit hücreler üzerindeki antigenotoksitesisi ve DNA hasar miktarı araştırılmıştır. Ayrıca, bitki ekstraktların antibakteriyel aktivitesi ve hemoliz oranı incelenmiştir. Elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

3.1 Antioksidan Kapasitesi Bulguları

Phlomis pungens var. *hirta* bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitesi DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleri ile araştırılmıştır. Referans olarak gallik asit ve trolox kullanılmıştır. *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin antioksidan kapasitesi sonuçları Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3 de verilmiştir.

3.1.1 DPPH Sonuçları

Tablo 3.1: DPPH sonuçları (ortalama ± standart hata).

Örnek	IC ₅₀ (µg/µL) ± SH
Su Ekstraktı	0,77 ± 0,009 ^{a,c}
Metanol Ekstraktı	0,18 ± 0,001 ^{a,b,c}
Etanol Ekstraktı	0,28 ± 0,002 ^{a,b}
Gallik asit (Pozitif Kontrol)	0,005 ± 0,000005 ^{b,c}

^a pozitif kontrole, ^b su ekstraktına ve ^c etanol ekstraktına kıyasla istatistiksel anlamlıdır (p < 0.05, t-Test)

3.1.2 ABTS Sonuçları

Tablo 3.2: ABTS sonuçları (ortalama ± standart hata).

Örnek	IC ₅₀ (µg/µL) ± SH
Su Ekstraktı	1,03 ± 0,031 ^{a,c}
Metanol Ekstraktı	0,45 ± 0,004 ^{a,b,c}
Etanol Ekstraktı	0,68 ± 0,009 ^{a,b}
Gallik asit (Pozitif Kontrol)	0,001885 ± 0,000004 ^{b,c}

^a pozitif kontrole, ^b su ekstraktına ve ^c etanol ekstraktına kıyasla istatistiksel anlamlıdır (p < 0.05, t-Test)

3.1.3 FRAP Sonuçları

Tablo 3.3: FRAP sonuçları (ortalama \pm standart hata).

Örnek	$\mu\text{g/g} \pm \text{SH}$
Su Ekstraktı	$30,71 \pm 0,007^{a,c}$
Metanol Ekstraktı	$92,58 \pm 0,005^{a,b,c}$
Etanol Ekstraktı	$79,74 \pm 0,007^{a,b}$
Trolox (Pozitif Kontrol)	$1,25 \pm 0,007^{b,c}$

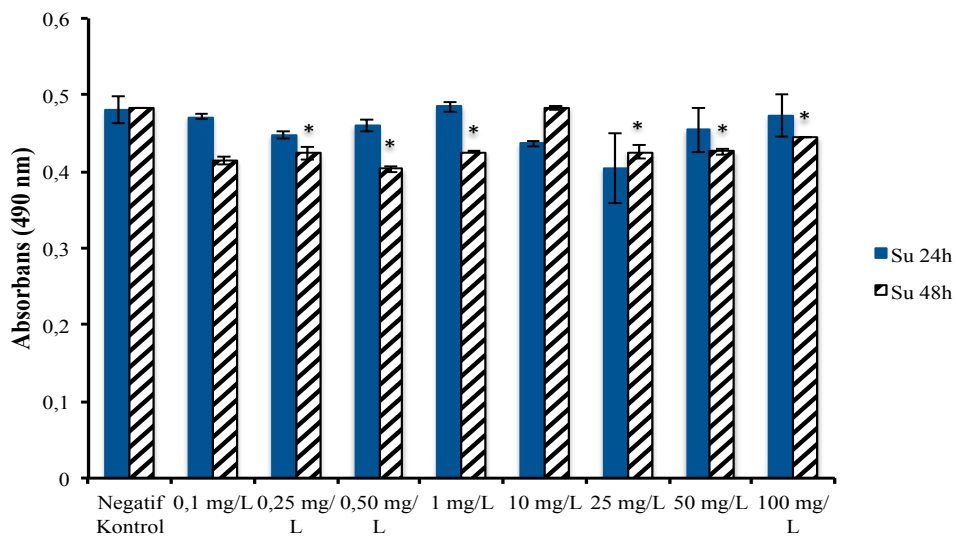
^a pozitif kontrole, ^b su ekstraktına ve ^c etanol ekstraktına kıyasla istatistiksel anlamlıdır ($p < 0.05$, t -Test)

3.2 Sitotoksosite Bulguları

Phlomis pungens var. *hirta* bitki ekstraktlarının sitotoksitesi MTS yöntemi ile belirlenmiştir. Lenfosit hücreler su, metanol ve etanol ekstraktları ile 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Her günün sonunda MTS reaktifi eklenip 490 nm'de absorbansları ölçülmüştür.

3.2.1 Su Ekstraktın MTS Testi Sonuçları

Su ekstraktının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen MTS test sonuçları Şekil 3.1 de verilmiştir.

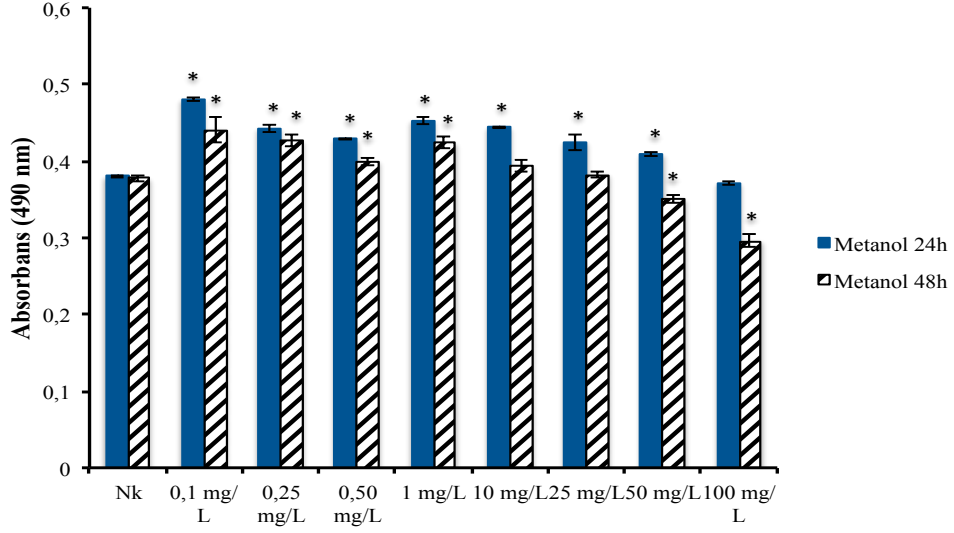


* negatif kontrole kıyasla istatistiksel anlamlıdır ($p < 0.05$, t -Test)

Şekil 3.1: Su ekstraktı ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiş hücrelerin MTS test sonuçları.

3.2.2 Metanol Ekstraktın MTS Testi Sonuçları

Metanol ekstraktının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen MTS test sonuçları Şekil 3.2 de verilmiştir.

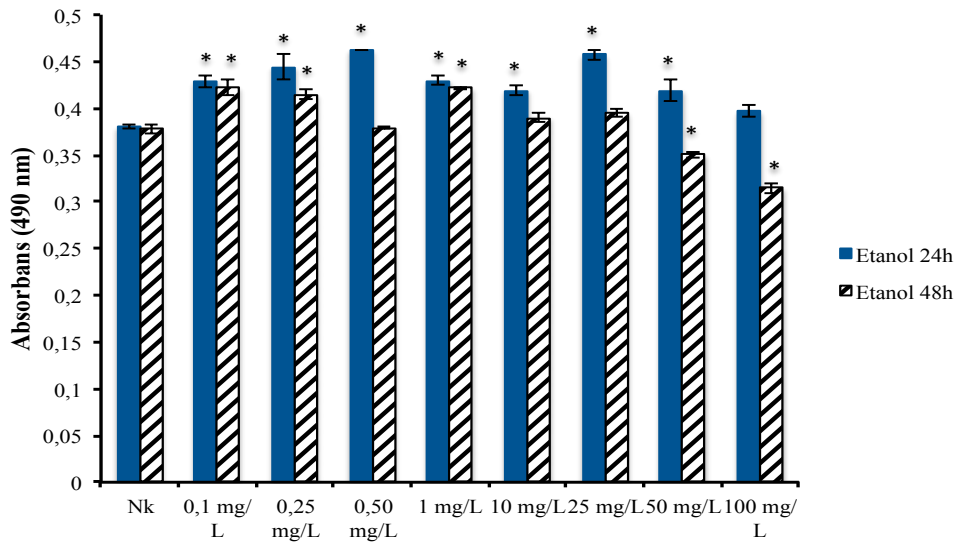


* negatif kontrole kıyasla istatistiksel anlamlıdır ($p < 0.05$, t -Test)

Şekil 3.2: Metanol ekstraktı ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiş hücrelerin MTS test sonuçları.

3.2.3 Etanol Ekstraktın MTS Testi Sonuçları

Etanol ekstraktının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen MTS test sonuçları Şekil 3.3 de verilmiştir.



* negatif kontrole kıyasla istatistiksel anlamlıdır ($p < 0.05$, t -Test)

Şekil 3.3: Etanol ekstraktı ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiş hücrelerin MTS test sonuçları.

3.3 Genotoksisite Bulguları

Phlomis pungens var. *hirta* bitki ekstraktlarının genotoksik etkileri mikronükleus yöntemi ve 8-OHdG tespiti ile belirlenmiştir.

3.3.1 Mikronükleus Testi Sonuçları

Lenfosit hücrelerinin su, metanol ve etanol bitki ekstraktları ile inkübasyonu sağlanmış (50 mg/mL) ve fiksasyon işlemi sonrasında ışık mikroskobu ile binükleer hücreler ve onların içerisinde bulunan mikronükleuslu olanlar saptanmıştır. Binükleer hücrelerde gözlemlenen mikronükleus oranları (% MN) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) sonuçları Tablo 3.4'de verilmiştir.

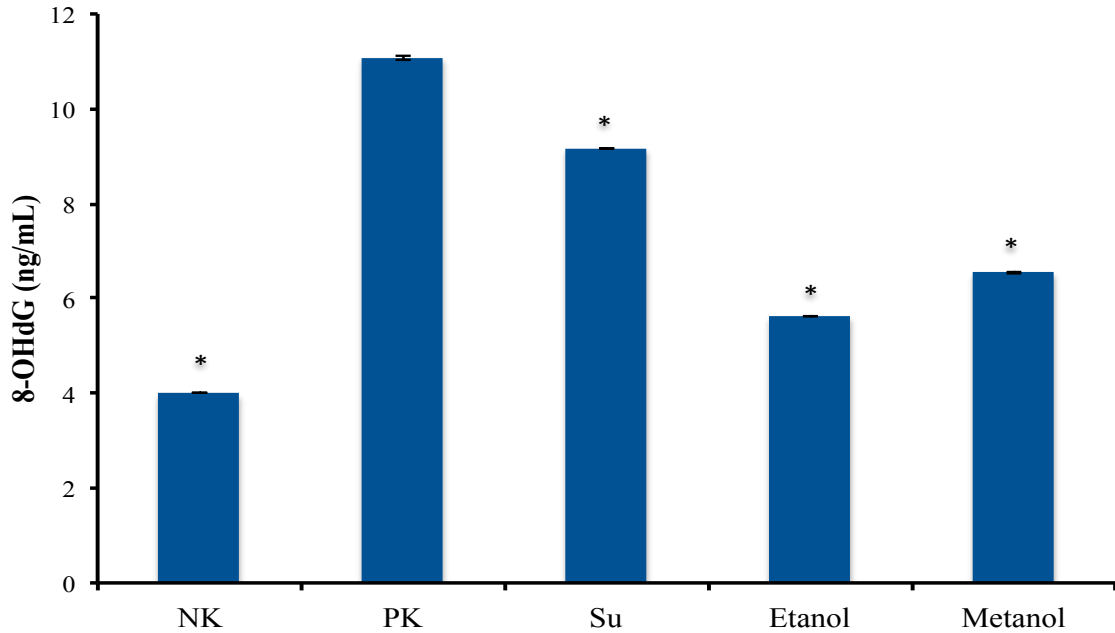
Tablo 3.4: Mikronükleus testin sonucunda %MN ve NBİ oranları (ortalama \pm standart hata).

Örnekler	% MN \pm SH	NBİ \pm SH
Negatif Kontrol	11,44 \pm 2,88 ^b	1,29 \pm 0,04
Pozitif Kontrol	30,12 \pm 1,63 ^a	1,32 \pm 0,01
Su Kontrol (%5 v/v)	4,87 \pm 0,69 ^b	1,32 \pm 0,005
Metanol Kontrol (%5 v/v)	15,48 \pm 0,56 ^b	1,35 \pm 0,003
Etanol Kontrol (%5 v/v)	14,01 \pm 0,71 ^b	1,35 \pm 0,001
Su Ekstraktı	5,18 \pm 0,33 ^b	1,33 \pm 0,0002
Su H ₂ O ₂ Ekstraktı	7,77 \pm 0,08 ^b	1,41 \pm 0,01 ^a
Metanol Ekstraktı	14,00 \pm 2,32 ^b	1,41 \pm 0,1
Metanol H ₂ O ₂ Ekstraktı	17,09 \pm 4,04 ^b	1,49 \pm 0,01 ^a
Etanol Ekstraktı	11,66 \pm 2,78 ^b	1,19 \pm 0,01
Etanol H ₂ O ₂ Ekstraktı	20,18 \pm 3,88	1,30 \pm 0,03

^a negatif kontrole, ^b pozitif kontrole kıyasla istatistiksel anlamlıdır ($p < 0,05$, *t*-Test)

3.3.2 8-OHdG Tespitin Sonuçları

Lenfosit hücrelerinin su, metanol ve etanol bitki ekstraktları ile inkübasyonu sonrasında meydana gelen oksidatif DNA hasarı ELISA kiti kullanılarak belirlenmiştir. Ölçülen 8-OHdG konsantrasyonları Şekil 3.4 de verilmiştir.

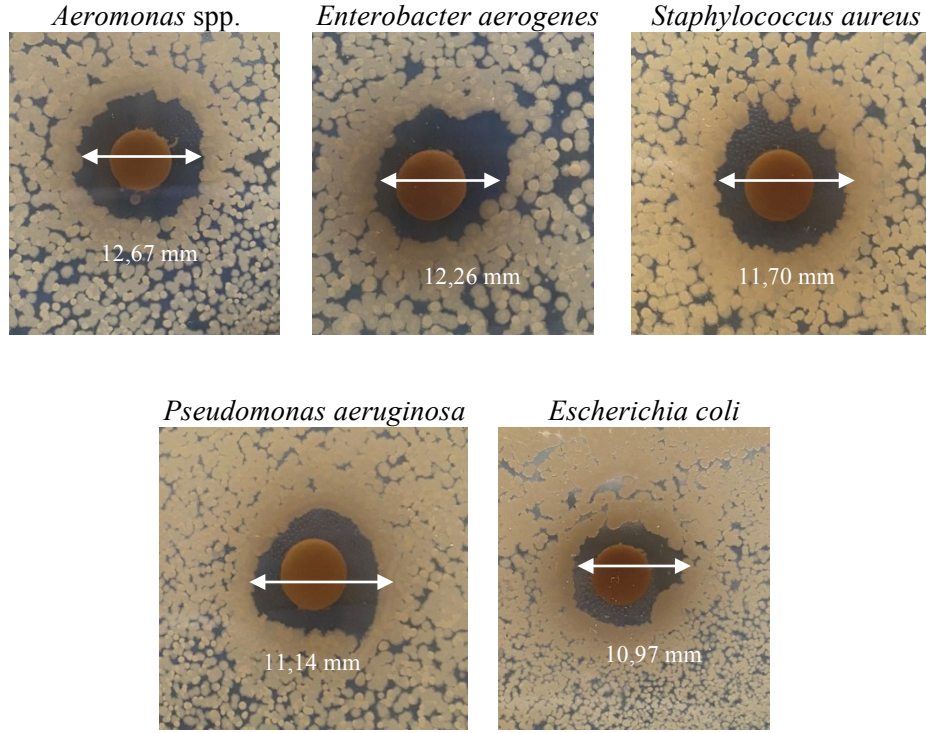


* pozitif kontrole kıyasla istatistiksel anlamlıdır ($p < 0,05$, t -Test)

Şekil 3.4: 8-OHdG tespit sonuçları.

3.3.3 Antibakteriyel Aktivitesi Bulguları

Phlomis pungens var. *hirta* bitkisinin antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemi kullanılarak gram negatif bakteri türleri olan *Aeromonas spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Enterobacter aerogenes* ve gram pozitif bakteri türü olan *Staphylococcus aureus*'a karşı test edilmiştir. Oluşan inhibisyon çapları Şekil 3.5 ve Tablo 3.5 de gösterilmiştir.



Şekil 3.5: *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin antibakteriyel aktivitesi.

Tablo 3.5: *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin antibakteriyel aktivitesi.

Bakteri	<i>Phlomis pungens</i> var. <i>hirta</i> (mm ± SH)	Gentamisin (Pozitif Kontrol) (mm ± SH)
<i>Aeromonas spp.</i>	12,67 ± 0,32*	21,97 ± 0,28
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12,26 ± 0,47*	22,68 ± 0,09
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,70 ± 0,38*	24,71 ± 0,21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11,14 ± 0,33*	24,52 ± 0,15
<i>Escherichia coli</i>	10,97 ± 0,12*	22,60 ± 0,22

* pozitif kontrole kıyasla istatistiksel anlamlıdır (p< 0,05, *t*-Test)

3.3.4 Hemouyumluluk Bulguları

Phlomis pungens var. *hirta* bitkisinin kan üzerindeki hemoliz oranı Tablo 3.6 da gösterilmiştir.

Tablo 3.6: *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin hemoliz oranı.

Örnek	% hemoliz oranı
<i>Phlomis pungens</i> var. <i>hirta</i>	6,26

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Lamiaceae türü olan *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin su, metanol ve etanol ekstraktların antioksidan kapasitesi, insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, H₂O₂ ile indüklenmiş insan lenfosit hücreler üzerindeki antigenotoksik etkileri ve oksidatif DNA hasarı miktarları, antibakteriyel aktiviteleri ve hemouyumlulukları araştırılmıştır.

4.1 Antioksidan Kapasitesi Sonuçları

Phlomis pungens var. *hirta* bitkisinin su, metanol ve etanol ekstraktların antioksidan kapasitesi araştırılmış ve analizler sonucu elde edilen veriler Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3'de verilmiştir. Bu veriler incelendiğinde, hem DPPH hem ABTS testin sonuçlarında elde edilen IC₅₀ değerlerine göre *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin metanol ekstraktı (DPPH: 0.18 µg/µL, ABTS: 0.45 µg/µL) en yüksek antioksidan kapasite gösterirken, etanol ekstraktı (DPPH: 0.28 µg/µL, ABTS: 0.68 µg/µL) daha düşük ve su ekstraktı (DPPH: 0.77 µg/µL, ABTS: 1.03 µg/µL) en düşük antioksidan kapasite göstermiştir. Bu sonucu kontrol grubu olan gallik asite kıyasla istatistiksel anlamlıdır (p < 0.05, *t*-Test). FRAP verileri de benzer sonuçlar göstermiştir. *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin metanol ekstraktı (92.58 µg/g) en yüksek metal şelatlama kapasitesi gösterirken, etanol ekstraktı (79.74 µg/g) daha düşük ve su ekstraktı (30.71 µg/g) en düşük şelatlama kapasitesi göstermiştir. Bu sonucu kontrol grubu olan trolox kıyasla istatistiksel anlamlıdır (p < 0.05, *t*-Test). *Phlomis* cinsine ait farklı türler ile daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde benzer antioksidan aktivite sonuçları elde edildiği görülmektedir. Örneğin Firuzi ve arkadaşları, *Phlomis elliptica*, *Phlomis olivieri*, *Phlomis persica* ve *Phlomis bruguieri* türlerinin metanol ekstraktlarının antioksidan kapasitelerini ve metal şelatlama kapasiteleri belirlemek için DPPH ve FRAP yöntemlerini kullanmışlardır. Sonuçlarda, dört bitkiden *Phlomis olivieri* en yüksek radikal süpürücü aktivite gösterirken (0.42 µg/µL) *Phlomis persica* en düşük radikal süpürücü aktivite göstermiştir (1.19 µg/µL). FRAP sonuçlarına göre, *Phlomis* türlerin arasında *Phlomis eliptica* en yüksek metal şelatlama kapasitesi gösterirken (23.1 µM/g DW), *Phlomis bruguieri* en düşük metal şelatma kapasitesi göstermiştir (11.0 µM/g DW) (Firuzi et al., 2010). Benzer şekilde Mekinic ve arkadaşları, ABTS yöntemi kullanarak Lamiaceae familyasına ait olan ve halk arasında çok bilinen adaçayı (*Salvia officinalis*), limon balsamı (*Melissa officinalis*), nane (*Mentha piperita*) ve iki kekik cinsi (*Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare*) olan baharat bitkilerin etanol/su

(80:20) ekstraktlarının antioksidan kapasitelerini belirlemişlerdir. Bu beş bitkiden limon balsamı en yüksek antioksidan kapasitesi gösterirken (0.23 µg/µL) kekik cinsi olan *Origanum vulgare* en düşük antioksidan kapasitesi göstermiştir (0.45 µg/µL) (Mekinić et al., 2014).

Oksidatif stres ortadan kaldırmak için birçok sentetik antioksidan geliştirilmiştir. Bununla birlikte, yüksek maliyet, ulaşılabilirlik ve yan etkiler gibi faktörler oksidatif stresle mücadelede hala büyük aksaklıklar oluşturmaktadır. Bu nedenle, doğal antioksidanlar çoğu zaman yan etkilerinin olmaması, daha ucuz olmaları ve birçok bitki kaynağında bol miktarda bulunmaları sebebiyle önem kazanmaktadırlar (Ravipati et al., 2012). Epidemiyolojik çalışmalar, daha yüksek meyve ve sebze alımının kardiyovasküler hastalıkların ve bazı kanserlerin ortaya çıkma riskini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir ve bu etki en azından kısmen antioksidanlara atfedilmektedir (Prior, 2003). Bununla birlikte, araştırmacılar β-karoten, vitamin E ve C gibi tek vitaminli antioksidanların yararlı etkiler göstermede daha başarısız olduklarını belirlemişlerdir (Lonn et al., 2005; Shahar et al., 1994). Bunun bir nedeni, diyet ile alınan bitkilerinin koruyucu etkilerinin, birçok bitkide yüksek seviyelerde bulunan flavonoidler gibi polifenoller, karotenoidler ve vitaminler gibi doğal antioksidanların birlikte meydana getirdikleri ortak-katkı etkilerinden kaynaklanması olabilmektedir (Xu et al., 2017; Liu, 2004). En önemli doğal antioksidan grubunu oluşturan fenolik maddelerin antioksidan aktivitesi de redoks özelliklerinden, yani indirgeyici ajanlar, hidrojen donörleri ve singlet oksijen söndürücüler olarak hareket etme yeteneklerinden ve bir dereceye kadar metal şelatlama potansiyellerinden kaynaklanmaktadır (Delazar et al., 2008). Bu nedenlerden dolayı, oksidatif stresin üstesinden gelmek için bütün bitki türevli ürünleri kullanmak, tek tek antioksidanları kullanmaktan daha iyi bir strateji gibi görünmektedir (Firuzi et al., 2010). Ancak günümüzde kullanılan birçok bitkisel ilaç dikkatli bir bilimsel değerlendirmeden geçmemiştir ve bazıları ciddi toksik etkilere neden olma potansiyeline sahiptirler. Bu nedenle bitkisel tıbbın güvenlik ve toksisitesi için bilimsel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır (Bhatt et al., 2012).

4.2 Sitotoksosite Sonuçları

Sağlıklı gönüllülerin kanından izole edilen lenfosit hücreleri *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin su, metanol ve etanol ekstraktları ile farklı konsantrasyonlarda (0,1 mg/L, 0,25 mg/L, 0,50 mg/L, 1 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L) ve belirli sürelerde (24 ve 48 saat) inkübe edilmiş ve hücrelerin canlılığında herhangi bir değişim olup olmadığı araştırılmıştır. Bulgular Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3’de verilmiştir. Su ekstraktının 24 saatlik MTS verilerine bakıldığında, hiçbir dozun hücre yaşamlılığını negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği ve 1 mg/L konsantrasyonundaki örneklerin en yüksek absorbansa sebep olduğu görülmektedir. Su ekstraktının 48 saatlik MTS verilerine bakıldığında ise, 10 mg/L konsantrasyonunda en yüksek, 0,50 mg/L konsantrasyonunda en düşük absorbansın meydana geldiği görülmektedir. İnkübasyon süreleri karşılaştırıldığında, su ekstraktının 24 saatlik inkübasyon sürecinin 48 saatlik inkübasyon sürecine göre daha yüksek absorbanslara sebep olduğu ve lenfosit yaşamlılığını daha az etkilediği sonucuna ulaşılmaktadır (Şekil 3.1). Metanol ekstraktının hem 24 saatlik hem 48 saatlik MTS verilerine bakıldığında, en düşük ekstrakt konsantrasyonu (0,1 mg/L) en yüksek absorbansı verirken, en yüksek ekstrakt konsantrasyonunun (100 mg/L) en düşük absorbansı verdiği görülmektedir (Şekil 3.2). Ayrıca, metanol ekstraktları ile gerçekleştirilen 24 saatlik inkübasyon sürecinin 48 saatlik inkübasyon sürecine göre daha yüksek absorbans verdiği görülmektedir. Negatif kontrol ile kıyaslandığında, metanol ekstraktının en düşük konsantrasyonunda hücre yaşamlılığını artırdığı ve ekstrakt konsantrasyonunun artması ile hücre yaşamlılığının azaldığı görülmektedir. Bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$, *t*-Test). Şekil 3.3 incelendiğinde etanol ekstraktının 24 saatlik inkübasyon sonucunda absorbanslarda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe sebep olmadığı ve hücre yaşamlılığını desteklediği görülmektedir. 48 saatlik inkübasyon sonunda ise etanol ekstraktlarının sadece yüksek dozlarında (50 ve 100 mg/L) istatistiksel olarak anlamlı düşüşler gözlenmiştir ($p < 0.05$, *t*-Test). Metanol ekstraktına benzer şekilde etanol ekstraktının da 24 saatlik inkübasyon süreci sonunda 48 saatlik inkübasyon sürecine göre daha yüksek absorbanslara sebep olduğu görülmektedir. Genel olarak etanol ekstraktı negatif kontrol ile kıyaslandığında, etanol ekstraktının en düşük konsantrasyonunda hücre yaşamlılığının arttığı ve ekstrakt konsantrasyonunun artması ile hücre yaşamlılığının azaldığı görülmektedir ($p < 0.05$, *t*-Test). Üç ekstrakt birbiriyle karşılaştırıldığında, hem 24 hem 48 saatlik inkübasyon süreçlerinde metanol ve etanol ekstraktlarının konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak insan lenfosit hücrelerinin yaşamlılığını azalttığı

gözlemlenmektedir. Su ekstraktında ise artan konsantrasyona bağlı olarak insan lenfosit hücrelerinin yaşamlılığının azalmadığı gözlemlenmiştir.

Literatüre bakıldığında, *Phlomis* cinsine ait olan farklı bitkilerle yapılan sitotoksik çalışmalarda benzer şekilde konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı gözlemlenmiştir. Mamadalieva ve arkadaşları *Phlomis bucharica* türün HeLa ve HL-60 lösemi hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini MTT yöntemini kullanarak araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda *Phlomis bucharica* bitkisinin metanol, hekzan, kloroform ve su ekstraktların konsantrasyonların artmasına bağlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Mamadalieva et al., 2015). Sarkhail ve arkadaşları, MTT yöntemi kullanarak altı *Phlomis* türünden (*Phlomis anisodonteia*, *Phlomis bruguieri*, *Phlomis caucasica*, *Phlomis olivieri*, *Phlomis persica* ve *Phlomis kurdica*) hazırlanan metanol ekstraktlarının dört farklı insan kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmada elde edilen verilere göre, altı ekstraktın hepsinin en az bir kanser hücre hattına karşı sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Sarkhail et al., 2017). Thoppil ve arkadaşları, MTT yöntemi kullanarak 48 saatlik inkübasyon süreci sonunda *Phlomis platystedia* türünün insan hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Thoppil et al., 2013). Lamiaceae familyasına ait farklı bitkilerle yapılan sitotoksikite çalışmalara incelendiğinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Varalakshmi ve arkadaşları Lamiaceae familyasına ait olan *Coleus aromaticus* türünün su ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (50, 100, 200 µg/mL) insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini MTT yöntemini kullanılarak araştırmışlardır. Çalışmaların sonucunda, artan bitki ekstrakt konsantrasyonu ile hücre yaşamlılığının azaldığı gözlemlenmiştir (Varalakshmi et al., 2011). Cocan ve arkadaşları Lamiaceae familyasına ait olan *Melissa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L. ve *Salvia officinalis* L. bitki türlerinin etanol ekstraktlarının (50 µg/mL ve 100 µg/mL) fare ve insan melanoma hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT yöntemini kullanarak incelemişlerdir ve artan ekstrakt konsantrasyonuyla hücre yaşamlılığının azaldığını gözlemlenmiştir (Cocan et al., 2018). Şimşek Sezer ve Uysal MTT yöntemi kullanarak Lamiaceae familyasına ait ve Türkiye’de endemik olan *Sideritis niveotomentis* türün yaprak ve çiçek kısımlarının metanol ve aseton ekstraktlarının bir bağırsak kanseri hücre hattı ve iki lösemi hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreçleri sonunda araştırmışlardır. Tüm ekstraktların yüksek dozlarda (62 µg/mL – 1000

$\mu\text{g/mL}$) lösemi hücre hattı (özellikle ARH 77) üzerinde güçlü sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Şimşek Sezer & Uysal, 2021).

Terapötik tedavilerde bitki ekstraktlarının ve fitokimyasalların kullanımı büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, doğada tıbbi bitkiler böceklerle, otçullara ve enfeksiyonlara karşı bir savunma görevi gören, fakat genellikle bunlarla beslenen diğer organizmaları da etkileyen toksik maddeleri sentezlemektedirler. Bu nedenle, tıbbi bitkilerin nispeten güvenli kullanımını sağlamak için sitotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesi gerekmektedir (Varalakshmi et al., 2011). Ayrıca, günümüze kadar kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yaklaşık %60'ı doğal ürünlerden izole edilmiştir ve bitki alemi bu doğal ürünlerin en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Doğal ürünler, kanserin önlenmesi ve tedavisi için yeni ajanlar olma potansiyelleri nedeniyle son 30 yılda artan bir ilgi görmüşlerdir. Buna paralel olarak, bitki bileşiklerinin, tümörjenezin çeşitli aşamalarının ve onunla ilişkili enflamatuvar süreçlerin inhibitörleri olarak potansiyeline dair artan kanıtlar mevcuttur, bu ise ürünlerin kanserin önlenmesi ve tedavisindeki önemini altını çizmektedir (Solowey et al., 2014).

4.3 Antigenotoksisite Sonuçları

Bu çalışmada *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin su, metanol ve etanol ekstraktlarının (50 mg/mL) H_2O_2 ile indüklenmiş insan lenfosit hücreleri üzerindeki antigenotoksik etkileri mikronükleus yöntemi ile araştırılmıştır. Tablo 3.4 deki verilere göre, H_2O_2 'ye maruz bırakılan hücrelerin (pozitif kontrol) mikronükleus oranı %30.12 iken negatif kontrolde bu oran %11.44'dir. H_2O_2 'ye maruz bırakılan hücrelerde görülen bu artış negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Su, metanol ve etanol ekstraktlarıyla indüklenen lenfosit hücrelerinde mikronükleus oluşumunda negatif kontrole kıyasla önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir ($p < 0.05$, *t*-Test). *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin ekstraktları ve H_2O_2 ile indüklenen lenfosit hücrelerinde mikronükleus oluşumu (su H_2O_2 ekstraktı %7.77, metanol H_2O_2 ekstraktı % 17.09, etanol H_2O_2 ekstraktı %20.18), sadece pozitif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir ($p < 0.05$, *t*-Test). *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin su, metanol ve etanol ekstraktları, lenfosit hücreleri üzerinde herhangi bir genotoksik etki göstermezken H_2O_2 'nin sebep olduğu genotoksik hasarı da azaltmıştır. Çözücü kontrolleri incelendiğinde, özellikle etanol

ve metanol çözücüler ile maruz bırakılan lenfosit hücrelerin mikronükleus oranları (metanol kontrol %15,48, etanol kontrol %14,04) negatif kontrole kıyasla oldukça yüksek çıkmıştır. Bu sonucuna göre, bitki ekstraktlarının gösterdiği antijenotoksik etkiye çözücülerin etkisi olmamıştır. Nükleer bölünme indeksi (NBİ) sonuçlarına bakıldığında, etanol ekstraktı dışında, bütün ekstraktların NBİ oranları negatif kontrole göre bir artış göstermektedirler. Özellikle su H₂O₂ ve metanol H₂O₂ ekstraktlarındaki artış negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p < 0.05, t-Test). NBİ yeterli hücre proliferasyonu için kullanılan bir indikatör değeridir. NBİ'deki bir azalma hücre proliferasyon kapasitesinin bir kaybı anlamına gelmektedir (Sekeroglu & Atli Sekeroglu, 2011). Çalışmanın bulgularında genel olarak öyle bir azalma gözlenmemiştir ve bu sonuçlar H₂O₂ ile indüklenmiş insan lenfosit hücrelerinde bir DNA hasarına meydana geldiğini fakat hücre yaşamlılığını azaltmadığını göstermiştir.

Literatüre bakıldığında, bu çalışmaya benzer şekilde Dirican ve arkadaşları Lamiaceae bitki ailesine ait olan *Thymbra spicata* L. türünün su, metanol ve etanol ekstraktlarının, cıva ile indüklenmiş insan lenfosit hücreleri üzerindeki antijenotoksik etkilerini mikronükleus yöntemi ile araştırmışlardır. Sonuç olarak, *Thymbra spicata* ekstraktların cıva ile indüklenmiş mikronükleus oluşumlarını önlemedeki olumlu etkisini tespit etmişlerdir. Özellikle metanol ekstraktı, etanol ekstraktından daha yüksek bir etki göstermiştir (Dirican et al., 2012). Çeker ve arkadaşları da mikronükleus yöntemi kullanarak Lamiaceae familyasına ait olan *Origanum vulgare* L. türünden hazırlanan esansiyel yağın aflatoksin B1'in insan lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik etkisine karşı meydana getirdiği antijenotoksik aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre 1 µL, 1.5 µL ve 2.0 µL konsantrasyonlarındaki esansiyel yağın aflatoksin B1'e karşı en yüksek antijenotoksik etkiyi gösterdiği belirtilmiştir (Ceker et al., 2012).

Ayrıca, bu çalışmada *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin su, metanol ve etanol ekstraktlarının H₂O₂ ile indüklenmiş insan lenfosit hücreleri üzerindeki antijenotoksik etkileri 8-OHdG miktarının tespit edilmesi ile araştırılmıştır. Şekil 3.4'de verilen sonuçlara göre, su, metanol ve etanol ekstraktları ile inkübe edilmiş hücrelerde meydana gelen 8-OHdG miktarında pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana geldiği görülmektedir (p < 0.05, t-Test). 8-OHdG miktarı su, metanol,

etanol ekstraktı şeklinde sırasıyla azalmaktadır. Bu sonuçlar, *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin etanol ekstraktının H₂O₂ ile indüklenmiş insan lenfosit hücrelerinde meydana gelen DNA modifikasyonunu en iyi inhibe ettiğini ortaya koymaktadır. Benzer bir çalışmaya bakıldığında, Alkofahi ve arkadaşları Lamiacea familyasına ait olan *Salvia triloba* yapraklarının etanol ekstraktının insan lenfosit hücreleri üzerinde meydana gelen oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkisini *in vitro* 8-OHdG testi kullanarak araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre, etanol ekstraktı test edilen tüm konsantrasyonlarda (10 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) 8-OHdG seviyelerinde önemli düşüslere sebep olmuştur (Alkofahi et al., 2016).

Phlomis L. cinsine ait farklı türler ile yapılan çeşitli çalışmalar, bu cinsin genel olarak antigenotoksik ve antimutajenik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, Uysal ve arkadaşları Ames testi kullanarak *Phlomis nissoli*, *Phlomis pungens* var. *pungens* ve *Phlomis armeniaca* türlerinin metanol, etil asetat ve su ekstraktlarının önemli antigenotoksik etkilere sahip olduklarını göstermişlerdir (Uysal et al., 2016). Dellai ve arkadaşları da *Phlomis crinita* Cav. türünün etil asetat, kloroform ve metanol ekstraktlarının antigenotoksik etkilerini Ames testi ile göstermişlerdir (Dellai et al., 2009). Bir başka çalışmada ise Limem ve arkadaşları Ames testi kullanarak *Phlomis mauritanica* metanol ve etil asetat ekstraktlarının mutasyonları ve oksidasyon etkileri önleme kapasitesine sahip olduklarını göstermişlerdir (Limem et al., 2010).

DNA lezyonlarının başlıca kaynakları, çevreden gelen DNA'ya zarar veren ajanlar, hücrel metabolik ara ürünler, DNA'nın spontan kimyasal reaksiyonları (deaminasyon, depurinasyon), yabancı veya hasarlı nükleotidlerin dahil edilmesi olarak bilinmektedir. Onarılmamış DNA lezyonları replikasyonu ve transkripsiyonu engelleyebilir, potansiyel olarak hücre ölümüne yol açabilir veya mutasyonlar oluşturarak yanlış kodlama bilgisi oluşturabilmektedir (Knezevic-Vukcevic et al., 2007). Son yıllarda, çok çeşitli tıbbi bitkiler ve bunların metabolitleri, zararlı kimyasalların mutajenik ve kanserojen etkilerini azaltma potansiyelleri için incelenmiştir, çünkü bu doğal bileşikler serbest radikalleri ve oksidatif stresin neden olduğu DNA ve hücrel hasarları inhibe edebilme yeteneklerine sahiptirler (Bouguellid et al., 2020). Yine de geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan bitkilerin genotoksik ve antigenotoksik potansiyelleri hakkında bilgi eksikliği mevcuttur, bu nedenle

bu bitki ekstraktlarının genetik materyal üzerindeki olası etkisinin değerlendirilmesi önemlidir. Genomik hasar ve karsinogenez arasındaki güçlü korelasyon nedeniyle, bitki ekstraktlarının antigenotoksik potansiyellerinin anlaşılması kanserin kemoprevensiyonunda faydalı olabilmektedir (Oyeyemi & Bakare, 2013).

4.4 Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

Phlomis pungens var. *hirta* bitkisinin etanol ekstraktının antibakteriyel etkisi gram negatif bakteri türleri olan *Aeromonas* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter aerogenes* ve gram pozitif bakteri türü olan *Staphylococcus aureus*'a karşı araştırılmıştır. Bulgular Şekil 3.5 ve Tablo 3.5 de verilmiştir. *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisi gram negatif bakteri türü olan *Aeromonas* spp.'e karşı en yüksek antibakteriyel etki gösterirken (inhibisyon çapı: 12.67 mm) *Escherichia coli*'ye karşı en düşük etki göstermiştir (inhibisyon çapı: 10.97 mm). Bitkinin gram pozitif bakteri türü olan *Staphylococcus aureus*'a karşı olan antibakteriyel etkisi de diğer gram negatif türlere göre daha düşüktür (inhibisyon çapı: 11.70 mm). Benzer şekilde, Alpay ve arkadaşları *Phlomis* L. cinsine ait olan *Phlomis russliana* türünün etanol ekstraktının *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakteri suşlarına karşı olan antibakteriyel aktivitelerini disk difüzyon testi kullanarak araştırmışlardır. Oluşan inhibisyon çapları şu şekilde verilmiştir: *E. coli*: 10 mm, *P. aeruginosa*: 11.2 mm, ve *S. aureus*: 12.4 mm. Alpay ve arkadaşları tarafından elde edilen sonuçlar, bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile yüksek benzerlik göstermektedir (Alpay et al., 2019). Al Laham ve Al Fadel de beş farklı bitki etanol ekstraktların antibiyotiğe dirençli bir *Aeromonas* suşu olan *A. hydrophila*'ya karşı antibakteriyel aktivitelerini disk difüzyon yöntemi ile belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda Lamiaceae familyasına ait olan *Thymus vulgaris* ve *Rosmarinus officinalis* etanol ekstraktları diğer bitkilere göre en yüksek antibakteriyel aktivite göstermişlerdir (Al Laham & Al Fadel, 2014). Literatürde *Phlomis pungens* var. *hirta* türü ile yapılan başka antibakteriyel çalışmalar da mevcuttur. Ulukanlı ve Akkaya *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin heksan, aseton ve metanol ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerini disk difüzyon yöntemi ile test etmişlerdir. Çalışmada üç farklı *Staphylococcus aureus* suşu, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter cloacae*, *taphylococcus epidermidis* ve *Enterococcus faecalis* bakteri suşları kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, *Phlomis pungens* var. *hirta*'nın aseton ve metanol ekstraktları antibakteriyel aktivite göstermemiştir ama heksan ekstraktı (disk başına 1000 µg) etten izole edilmiş *S. aureus*, *S. aureus* ATTC 6538 ve *S. epidermidis* suşlarına karşı

en yüksek antibakteriyel aktiviteyi göstermiştir (inhibisyon çapı: 10 mm) (Ulukanli & Akkaya, 2011). Özcelik ve arkadaşları, *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin petrol eteri ve metanol ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi araştırmışlar ve *Phlomis pungens* var. *hirta* ekstraktların antibakteriyel ve antifungal aktivitesine sahip olduğunu ancak antiviral aktivitesine sahip olmadığını göstermişlerdir (Özcelik et al., 2010). Özkan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin metanol ekstraktının özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis*'e karşı antibakteriyel bir etki oluşturduğu gösterilmiştir (Özkan et al., 2009).

Çoklu ilaca dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkması ve yayılması, patojenik bakterilerin neden olduğu enfeksiyon için daha az veya bazen hiç etkili antimikrobiyal ajan bulunmaması nedeniyle önemli bir halk sağlığı tehdidi haline gelmiştir. Bu nedenle yeni antimikrobiyal ajanların bulunması büyük önem taşımaktadır. Çok sayıda şifalı bitki doğal antimikrobiyal bileşikler olabilmeleri sebebiyle bu sorunlu bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkili bir alternatif sunmaktadırlar (Manandhar et al., 2019).

4.5 Hemouyumluluk Sonucu

Tablo 3.6'da *Phlomis pungens* var. *hirta* bitki tozunun 545 nm'de ölçülen absorbanslarına göre hesaplanan % hemoliz oranları verilmiştir. Shanthini G. ve arkadaşları, bir materyalin neden olduğu hemoliz oranı % 5'in altında ise bu materyalin yüksek düzeyde hemouyumlu, %10'a kadar ise hemouyumlu ve % 20'den fazla ise hemouyumlu olmayan olarak sınıflandırılması gerektiğini belirtmişlerdir (Shanthini et al., 2015). Bu çalışmada yapılan deney sonucuna göre *Phlomis pungens* var. *hirta* bitki tozunun hemoliz oranı % 6.26'dır ve hemouyumlu bir materyal olarak sınıflandırılabilir. Son yıllarda, çeşitli tıbbi bitkilerin hemouyumluluk özellikleri araştırılmıştır. Örneğin, Kumar ve arkadaşları, Hindistan'da tıbbi bitkiler olarak kullanılan bazı türlerin hemouyumluluğu araştırmışlardır. Araştırmacılar, *Aerva lanata* ve *Calotropis gigantea* tıbbi bitkilerinin hemolitik aktivitesini çok düşük bulmuşlardır ve *Elaeocarpus ganitus* tıbbi bitkisinin de hemouyumlu olduğunu göstermişlerdir (G. Kumar et al., 2011). Sephai ve arkadaşları da İran'da bulunan *Echinophora orientalis*, *Nasturtium microphyllum* ve *Verbascum thapsus* şifalı bitkilerinin hemouyumlu özelliklere sahip olduklarını göstermişlerdir (Sepahi et al., 2014). Alinezhad ve arkadaşları, Rusya, İspanya, Fransa ve İtalya'da şifalı bitki olarak kullanılan züfaotun

(*Hyssopus officinalis*) bitkisinin yüksek antihemolitik aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir (Alinezhad et al., 2013).

Spesifik olmayan çeşitli mekanizmalar hemolize neden olabilir. Hemolitik aktivite, hücre membranında por oluşumunun, dolayısıyla membran geçirgenliğinin değişmesinin bir sonucu olabilir veya sodyum-potasyum ve kalsiyum magnezyum ATPaz aktivitelerinin değişmesinden kaynaklanabilmektedir (Mukherjee & Rajasekaran, 2010). Bitki ekstraktlarının insan kanı üzerindeki etkisini incelerken hemolitik aktiviteyi belirlemek önemlidir, çünkü bu genel sitotoksosite ve biyoaktivitenin bir göstergesidir (Oliveira et al., 2009).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Lamiaceae familyasına ait olan *Phlomis pungens* var. *hirta* türünün su, metanol ve etanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesi, insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, H₂O₂ ile indüklenmiş insan lenfosit hücreleri üzerindeki antigenotoksik etkileri ve oksidatif DNA hasarı miktarları, antibakteriyel aktiviteleri ve hemouyumlulukları araştırılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin metanol ekstraktı (DPPH: 0.18 µg/µL, ABTS: 0.45 µg/µL, FRAP: 92,58 µg/g) en yüksek antioksidan ve metal şelatlama kapasitesi gösterirken, etanol ekstraktı (DPPH: 0.28 µg/µL, ABTS: 0.68 µg/µL, FRAP: 79.74 µg/g) daha düşük ve su ekstraktı (DPPH: 0.77 µg/µL, ABTS: 1.03 µg/µL, FRAP: 30.71 µg/g) en düşük antioksidan ve metal şelatlama kapasitesi göstermiştir.
- *Phlomis pungens* var. *hirta* bitki ekstraktlarının sitotoksik aktivitesine bakıldığında, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreçlerinde özellikle metanol ve etanol ekstraktlarının artan konsantrasyonu ile insan lenfosit hücrelerin yaşamlılığının azalttığını ancak su ekstraktının artan konsantrasyonuna bağlı olarak insan lenfosit hücrelerinin yaşamlılığının azaltmadığını gözlemlenmiştir.
- *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinin su, metanol ve etanol ekstraktlarının insan lenfosit kültürlerinde H₂O₂ tarafından indüklenen mikronükleus oluşumları üzerinde antigenotoksik bir etkiye sahip olduklarını gözlemlenmiştir. Ayrıca, hücrelerde meydana gelen oksidatif DNA hasarı miktarının *Phlomis pungens* var. *hirta* ekstraktları ile inkübasyon sonrasında azaldığı tespit edilmiştir.
- *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisi gram negatif bakteri türü olan *Aeromonas* spp.'e karşı en yüksek antibakteriyel etki göstermiştir (inhibisyon çapı: 12.67 mm).
- *Phlomis pungens* var. *hirta* bitki tozu hemouyumlu bir materyal olarak sınıflandırılmıştır (hemoliz oranı: % 6,26).

Elde edilen sonuçlara dayalı olarak *Phlomis pungens* var. *hirta* bitkisinde bulunan sekonder metabolitler ileri biyokimyasal teknikler kullanılarak daha detaylı araştırılabilir ve *in vivo* testler ile daha detaylı toksikolojik değerlendirme yapılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Al Laham, S. A., & Al Fadel, F. M. (2014). Antibacterial activity of various plants extracts against antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(7), 1–7. <https://doi.org/10.5812/jjm.11370>
- Alinezhad, H., Azimi, R., Zare, M., Ebrahimzadeh, M. A., Eslami, S., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2013). Antioxidant and antihemolytic activities of ethanolic extract of flowers, leaves, and stems of *hyssopus officinalis* L. Var. *angustifolius*. *International Journal of Food Properties*, 16(5), 1169–1178. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.578319>
- Alkofahi, A., Alzoubi, K., Khabour, O., & Mhaidat, N. (2016). Screening of selected medicinal plants from Jordan for their protective properties against oxidative DNA damage. *Industrial Crops and Products*, 88.
- Alpay, M., Dulger, G., Sahin, I. E., & Dulger, B. (2019). Evaluating antimicrobial and antioxidant capacity of endemic *phlomis russeliana* from turkey and its antiproliferative effect on human caco-2 cell lines. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(3), 1–7. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180404>
- Altman, F. P. (1976). Tetrazolium Salts and Formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 9(3), 3–6. [https://doi.org/10.1016/S0079-6336\(76\)80015-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6336(76)80015-0)
- Anderson, J. M. (2012). 9.19 - Biocompatibility. In K. Matyjaszewski & M. Möller (Eds.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (pp. 363–383). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00229-6>
- Balant, S., Górski, S., Najda, A., & Walasek, M. (2019). Ekstrakty roślinne zawierające związki fenolowe i ich aktywność antyoksydacyjna. *Agronomy Science*, 73(4), 37–44. <https://doi.org/10.24326/asx.2018.4.4>
- Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Pezzo, M., Lavitola, A., Ritieni, A., Bruno, M., Spatuzzi, D., Rigano, D., & Vuotto, M. (2006). Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italic* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.019>
- Bhatt, I. D., Rawat, S., & Rawal, R. S. (2012). Chapter 13 Antioxidants in Medicinal Plants. In *Biotechnology for Medicinal Plants: Micropropagation and Improvement* (Vol. 9783642299, Issue March). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29974-2>

- Bouguellid, G., Russo, C., Lavorgna, M., Piscitelli, C., Ayouni, K., Wilson, E., Kim, H. K., Verpoorte, R., Choi, Y. H., Kilani-Atmani, D., Atmani, D., & Isidori, M. (2020). Antimutagenic, antigenotoxic and antiproliferative activities of *Fraxinus angustifolia* Vahl. leaves and stem bark extracts and their phytochemical composition. *PLoS ONE*, *15*(4), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230690>
- Büyüktuncel, E. (2013). Main spectrophotometric methods for the determination of total phenolic content and antioxidant capacity. *Marmara Pharmaceutical Journal*, *17*(2), 93–103. <https://doi.org/10.12991/201317377>
- Cakmak Demircigil, G., Emerce, E., & Ulutas, O. K. (2009). Genotoxicity tests from biomarker studies to the regulations: National perspective. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, *34*(4), 217–232.
- Ceker, S., Agar, G., Nardemir, G., Anar, M., Kizil, H. E., & Alpsoy, L. (2012). Investigation of anti-oxidative and anti-genotoxic effects of *Origanum vulgare* L. essential oil on human lymphocytes in vitro. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, *15*(6), 997–1005. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10662604>
- Celep, F., & Dirmenci, T. (2017). Systematic and Biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey. *Natural Volatiles & Essential Oils*, *4*(4), 14–27.
- Celikler, S., Vatan, O., Yildiz, G., & Bilaloglu, R. (2009). Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(4), 796–801. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.010>
- Cocan, I., Alexa, E., Danciu, C., Radulov, I., Galuscan, A., Obistioiu, D., Morvay, A. A., Sumalan, R. M., Poiana, M. A., Pop, G., & Dehelean, C. A. (2018). Phytochemical screening and biological activity of lamiaceae family plant extracts. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *15*(2), 1863–1870. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5640>
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. “Alexandru Ioan Cuza.” *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(4), 564–582. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). 4A Standard Calibration Techniques. *The Microflow E-Book*, *28*, 25–30.

- Daradka, H. M., Khabour, O. F., & Alotaibi, M. K. (2018). Potent antioxidative DNA damage of selected Saudi medicinal plants in cultured human lymphocytes. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(4), 1511–1517.
- Davis, P. (1972). *Flora of Turkey, Volume 10*. University Pres Edinburgh.
- de Oliveira Teixeira, R., Camparoto, M. L., Mantovani, M. S., & Pimenta Vicentini, V. E. (2003). Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in vitro and in vivo assays. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4), 551–555. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572003000400021>
- Delazar, A., Sabzevari, A., Mojarrab, M., Nazemiyeh, H., Esnaashari, S., Nahar, L., Razavi, S. M., & Sarker, S. D. (2008). Free-radical-scavenging principles from *Phlomis caucasica*. *Journal of Natural Medicines*, 62(4), 464–466. <https://doi.org/10.1007/s11418-008-0255-y>
- Dellai, A., Mansour, H. Ben, Limem, I., Bouhlel, I., Sghaier, M. Ben, Boubaker, J., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2009). Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the flowers of *Phlomis crinita* Cav. ssp *mauritanica* munby from the center of Tunisia. *Drug and Chemical Toxicology*, 32(3), 283–292. <https://doi.org/10.1080/01480540902882200>
- Demirci, B., Hüsnu Can Baser, K., & Dadandi, M. Y. (2006). Composition of the essential oils of *phlomis rigida* labill. And *p. samia* L. *Journal of Essential Oil Research*, 18(3), 328–331. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699103>
- Dirican, E., Turkez, H., & Toğar, B. (2012). Modulatory effects of *Thymbra spicata* L. different extracts against the mercury induced genotoxicity in human lymphocytes in vitro. *Cytotechnology*, 64(2), 181–186. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9406-1>
- Ehtesham-Gharaee, M., Eshaghi, A., Shojaee, S., Asili, J., Emami, S. A., Behravan, J., & Mosaffa, F. (2015). Protective effects of *Scutellaria lindbergii* root extract against oxidative-induced cell and DNA damage in mouse fibroblast-like cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(3), 293–299. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.954047>
- Ekin, H. N., Deliorman Orhan, D., Erdoğan Orhan, İ., Orhan, N., & Aslan, M. (2019). Evaluation of enzyme inhibitory and antioxidant activity of some lamiaceae plants. *Journal of Research in Pharmacy*, 23(4), 749–758.

<https://doi.org/10.12991/jrp.2019.184>

- Firuzi, O., Javidnia, K., Gholami, M., Soltani, M., & Miri, R. (2010). Antioxidant activity and total phenolic content of 24 lamiaceae species growing in Iran. *Natural Product Communications*, 5(2), 261–264. <https://doi.org/10.1177/1934578x1000500219>
- Galluzzi, L. (2009). Guidelines for the use and interpretation. *Cell Death and Differentiation*, 16(8), 1093–1107. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.44>.Guidelines
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Gammazza, A. M., Knap, N., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>
- Gougoulis, N., & Mashev, N. (2015). Antioxidant activity and polyphenols content of some herbal teas of lamiaceae family from Greece and bulgaria. *Oxidation Communications*, 38(1), 25–34.
- Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposia*, 61, 73–101. <https://doi.org/10.1042/bss0610073>
- Handayani, S., Dani, I. C., Budiawan, & Pakuanisa, D. (2017). Study of DNA adduct 8 hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) formation through fenton reaction with tert-butylhydroquinone (TBHQ) and butyl hydroxy toluene (BHT). *Journal of Physics: Conference Series*, 835(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/835/1/012015>
- Hartiadi, L. Y., & Sahamastuti, A. A. T. (2020). Protective effect of Caesalpinia sappan L. extract against H2O2-induced oxidative stress on hacat and its formulation as antioxidant cream. *Journal of Research in Pharmacy*, 24(4), 508–517. <https://doi.org/10.35333/jrp.2020.199>
- Inaba, Y., Koide, S., Yokoyama, K., & Karube, I. (2011). Development of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) measurement method combined with SPE. *Journal of Chromatographic Science*, 49(4), 303–309. <https://doi.org/10.1093/chrscl/49.4.303>
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50–59. <https://doi.org/10.17343/sdutfd.38962>
- Kasapçopur Özel, G., & Birdane, Y. (2014). Antioksidanlar. *Kocatepe Veteriner Dergisi*,

2(7).

- Kasnak, C., & Palamutoğlu, R. (2015). Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 3(5), 226. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v3i5.226-234.171>
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International Journal of Biological Sciences*, 11(8), 982–991. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12096>
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Knezevic-Vukcevic, J., Vukovic-Gacic, B., & Simic, D. (2007). Antigenotoxic effect of plant extracts. *Genetika*, 39(2), 207–226. <https://doi.org/10.2298/genstr0702207k>
- Kocabas, Y. Z., Erol, A., & Aktolun, O. (2017). Medicinal Plants of Flora of KSU Avsar Campus (Kahramanmaraş) and Surrounding Areas. *Aksaray University Journal of Science and Engineering*, 1(2), 32–42. <https://doi.org/10.29002/asujse.306972>
- Kumar, G., Karthik, L., & Rao, K. V. B. (2011). Haemolytic activity of Indian medicinal plants toward human erythrocytes: an in vitro study. *Elixir Applied Botany*, 40(June 2014), 5534–5537.
- Kumar, S., & Pandey, A. (2015). Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbals. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 7(6), 438–457. <https://doi.org/10.9734/bjmmr/2015/16284>
- Kuşaksız, G. (2019). Rare and Endemic Taxa of Lamiaceae in Turkey and Their Threat Categories. *Journal of Scientific Perspectives*, 3(1), 69–84. <https://doi.org/10.26900/jsp.3.008>
- Kyriakopoulou, I., Magiatis, P., Skaltsounis, A.-L., Aligiannis, N., & Harvala, C. (2001). Samioside, a New Phenylethanoid Glycoside with Free-Radical Scavenging and Antimicrobial Activities from *Phlomis s amia*. *Journal of Natural Products*, 64, 1095–1097.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and

- diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Limem, I., Bouhlel, I., Bouchemi, M., Kilani, S., Boubaker, J., ben sghaier, M., Skandrani, I., Behouri, W., Neffati, A., & Chekir-Ghedira, L. (2010). Phlomis mauritanica Extracts Reduce the Xanthine Oxidase Activity, Scavenge the Superoxide Anions, and Inhibit the Aflatoxin B1-, Sodium Azide-, and 4-Nitrophenyldiamine-Induced Mutagenicity in Bacteria. *Journal of Medicinal Food*, 13, 717–724.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0299>
- Lin, V. S., Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2013). Boronate-based fluorescent probes: Imaging hydrogen peroxide in living systems. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 526). Copyright © 2013 Elsevier, Inc. All rights reserved.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405883-5.00002-8>
- Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., Vassault, A. J., & Plebani, M. (2008). Haemolysis: An overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(6), 764–772. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.170>
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12 Suppl), 3479S-3485S.
<https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126.
<https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lonn, E., Bosch, J., Yusuf, S., Sheridan, P., Pogue, J., Arnold, J. M. O., Ross, C., Arnold, A., Sleight, P., Probstfield, J., & Dagenais, G. R. (2005). Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, 293(11), 1338–1347. <https://doi.org/10.1001/jama.293.11.1338>
- Mahomoodally, F. M., Subratty, A. H., Gurib-Fakim, A., & Choudhary, M. I. (2012). Antioxidant, antiglycation and cytotoxicity evaluation of selected medicinal plants of the Mascarene Islands. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-165>
- Mamadaliyeva, N. Z., Vinciguerra, V., Sobeh, M., Ovidi, E., Ashour, M. L., Wink, M., &

- Tiezzi, A. (2015). GLC-MS profiling of non-polar extracts from *Phlomis bucharica* and *P. salicifolia* and their cytotoxicity. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(6), 442–448.
- Manandhar, S., Luitel, S., & Dahal, R. K. (2019). In Vitro Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Tropical Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1895340>
- Maral, H., Türk, M., Çalışkan, T., Kafkas, E., & Kırıcı, S. (2017). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of six Lamiaceae plants growing in Southern Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 4(4), 62–68.
- Martins, G. V., Tavares, A. P. M., Fortunato, E., & Sales, M. G. F. (2017). Paper-Based Sensing Device for Electrochemical Detection of Oxidative Stress Biomarker 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in Point-of-Care. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14878-9>
- Mekinić, I. G., Skroza, D., Ljubenković, I., Šimat, V., Možina, S. S., & Katalinić, V. (2014). In vitro antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: A correlation study. *Food Technology and Biotechnology*, 52(1), 119–127.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Motlagh, D., Allen, J., Ryan, H., Jian, Y., Karen, L., & Guillermo, A. (2006). Hemocompatibility evaluation of poly(diols citrate) in vitro for vascular tissue engineering Delara. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 79(4), 907–916. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>
- Mukherjee, A., & Rajasekaran, C. (2010). In-vitro hemolytic activity of *Allium stracheyi* Baker. 3(5), 1160–1162.
- Oliveira, V. M. A. de, Carneiro, A. L. B., Cauper, G. S. de B., & Pohlit, A. M. (2009). In vitro screening of amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. *Acta Amazonica*, 39(4), 973–980. <https://doi.org/10.1590/s0044-59672009000400026>
- Oyeyemi, I. T., & Bakare, A. A. (2013). Genotoxic and anti-genotoxic effect of aqueous

- extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrica* L. on *Allium cepa* root tip cells. *Caryologia*, 66(4), 360–367.
<https://doi.org/10.1080/00087114.2013.857829>
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., & Yönden, Z. (2015). Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331–336. <https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545>
- Özcelik, B., Orhan, I., Kartal, M., & Konuklugil, B. (2010). In vitro testing of antiviral, antibacterial, antifungal effects and cytotoxicity of selected Turkish Phlomis species. *Acta Alimentaria*, 39(2), 119–125. <https://doi.org/10.1556/AAlim.39.2010.2.2>
- Özkan, O., Aydın, H., & Bağcigil, A. F. (2009). In vitro evaluation of antimicrobial activities of *Salvia verticillata* and *phlomis pungens*. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(4), 587–590. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2009.073-a>
- Parekh, J., Jadeja, D., & Chanda, S. (2005). Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Turkish Journal of Biology*, 29(4), 203–210.
- Pavlasova, L. (2015). Possibility of Use of Disc Diffusion Method in Inquiry-Based Tasks. *Projektové Vyučovani V Prirodních Predmetech Xiii*, 102–106.
- Prior, R. L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3 Suppl), 570S-578S.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.570S>
- Ramalakshmi, K., Rahath Kubra, I., & Jagan Mohan Rao, L. (2008). Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Research International*, 41(1), 96–103.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.003>
- Ravipati, A. S., Zhang, L., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Bartlett, J., Smith, P. T., Shanmugam, K., Münch, G., Wu, M. J., Satyanarayanan, M., & Vysetti, B. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 5–10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-173>
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990.

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>

- Ren, N., Atyah, M., Chen, W. Y., & Zhou, C. H. (2017). The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: Testing methods and clinical applications. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1218-4>
- Riss, T., & Moravec, R. (2002). Introducing the Cytotox-One™ Homogeneous Membrane Integrity Assay. *Cell Notes*, 4, 6–9.
- Robinson, W. S., & Lutwick, L. I. (1976). Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth. *New England Journal of Medicine*, 295(21), 1168–1175. <https://doi.org/10.1056/nejm197611182952105>
- Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-221>
- SAKS, M., Upreti, S., SV*, R., & Dang, R. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 1(5), 1–6. <https://doi.org/10.19080/GJPPS.2017.02.555575>
- Sanak, M., Jakiela, B., & Wegrzyn, W. (2010). Assessment of hemocompatibility of materials with arterial blood flow by platelet functional tests. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences*, 58(2), 317–322. <https://doi.org/10.2478/v10175-010-0029-z>
- Sarkhail, P., Sahranavard, S., Nikan, M., Gafari, S., & Eslami-Tehrani, B. (2017). Evaluation of the cytotoxic activity of extracts from six species of *Phlomis* genus. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(2), 180–184. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70225>
- Sastri, V. R. (2022). 4 - Material Requirements for Plastics Used in Medical Devices. In V. R. Sastri (Ed.), *Plastics in Medical Devices (Third Edition)* (Third Edit, pp. 65–112). William Andrew Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85126-8.00008-4>
- Sawant, R., Jathar, S., Rajadhyaksha, S., & Kadam, P. (2007). Red cell hemolysis during processing and storage. *Asian Journal of Transfusion Science*, 1(2), 47.

<https://doi.org/10.4103/0973-6247.33446>

- Sekeroglu, V., & Atli Sekeroglu, Z. (2011). Micronucleus test for determining genotoxic damage. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 68(4), 241–252. <https://doi.org/10.5505/turkhijyen.2011.06977>
- Sepahi, S., Ghorani-Azam, A., Sepahi, S., Soodeh, A. A., & Rostami, S. (2014). In vitro study to evaluate antibacterial and non-haemolytic activities of four Iranian medicinal plants. *West Indian Medical Journal*, 63(4), 289–293. <https://doi.org/10.7727/wimj.2013.095>
- Seyhan, S. A. (2019). DPPH · Antioksidan Analizinin Yeniden Değerlendirilmesi Re-Evaluating of The DPPH • Antioxidant Assay. 9(2), 125–135.
- Shahar, E., Folsom, a. R., Melnick, S. L., Tockman, M. S., Comstock, G. W., Gennaro, V., Higgins, M. W., Sorlie, P. D., Ko, W.-J., & Szklo, M. (1994). The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at Pfizer Japan Inc. on February 17, 2013. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1994 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. *The New England Journal of Medicine*.
- Shanthini, G. M., Martin, C. A., Sakthivel, N., Veerla, S. C., Elayaraja, K., Lakshmi, B. S., Asokan, K., Kanjilal, D., & Kalkura, S. N. (2015). Physical and biological properties of the ion beam irradiated PMMA-based composite films. *Applied Surface Science*, 329, 116–126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.12.129>
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Solowey, E., Lichtenstein, M., Sallon, S., Paavilainen, H., Solowey, E., & Lorberboum-Galski, H. (2014). Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/721402>
- Sujarwo, W., & Keim, A. P. (2019). *Spondias pinnata* (L. f.) Kurz. (Anacardiaceae): Profiles and Applications to Diabetes. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for*

Diabetes (pp. 395–405). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813822-9.00027-8>

- Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauh, C., & Brestic, M. (2018). Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(4), 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.036>
- Şekeroğlu, Z. A., & Şekeroğlu, V. (2011). Genetik Toksikite Testleri. *Türk Bilim Araştırma Vakfı Dergisi*, 4, 221–229.
- Şimşek Sezer, E. N., & Uysal, T. (2021). Phytochemical Analysis, Antioxidant and Anticancer Potential of *Sideritis niveotomentosa*: Endemic Wild Species of Turkey. *Molecules*, 26(9), 2420.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*, 2013(July). <https://doi.org/10.1155/2013/251754>
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6 23-6). <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.11005>
- Thoppil, R. J., Harlev, E., Mandal, A., Nevo, E., & Bishayee, A. (2013). Antitumor activities of extracts from selected desert plants against HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Pharmaceutical Biology*, 51(5), 668–674. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.749922>
- Tokur, O., & Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksikite Testleri Orhan TOKUR * , Abdurrahman AKSOY. *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112–118.
- Uğur Aydın, Z., Akpınar, K. E., Hepokur, C., & Erdönmez, D. (2018). Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Brazilian Oral Research*, 32, e119. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0119>
- Ulukanli, Z., & Akkaya, A. (2011). Antibacterial activities of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens* var. *hirta* grown wild in Eastern Anatolia, Turkey. *International*

Journal of Agriculture and Biology, 13(1), 105–109.

- Urbaniak, S. K., Boguszewska, K., Szewczuk, M., Kázmierzak-Barańska, J., & Karwowski, B. T. (2020). 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a potential biomarker for gestational diabetes mellitus (GDM) development. *Molecules*, 25(1).
<https://doi.org/10.3390/molecules25010202>
- Ustaoğlu Iyigünoğdu, Z., Demirci, S., Baç, N., & Şahin, F. (2014). Development of durable antimicrobial surfaces containing silver- and zinc-ion-exchanged zeolites. *Turkish Journal of Biology*, 38(3), 420–427. <https://doi.org/10.3906/biy-1311-41>
- Uysal, A., Gunes, E., Celik, H., Durak, Y., & Uren, M. (2016). New Prospective Materials for Chemoprevention: Three Phlomis. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 10. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2016/23963>
- Üstün Alkan, F., Esen Gürsel, F. E., Ateş, A., Özyürek, M., Güçlü, K., & Altun, M. (2012). Protective effects of *Salvia officinalis* extract against cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress in rats. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36(6), 646–654. <https://doi.org/10.3906/vet-1105-36>
- Varalakshmi, K. N., Sangeetha, C. G., Samee, U. S., Irum, G., Lakshmi, H., & Prachi, S. P. (2011). In vitro safety assessment of the effect of five medicinal plants on human peripheral lymphocytes. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1), 33–40. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i1.66539>
- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., & Li, H. Bin. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 20–31. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>
- Yıldız, G., Aktürk, C., Özerkan, M., & Yılmaz, Ö. (2020). *Linum arboreum* L. (Linaceae) Türünün Antioksidan İçeriği ve Serbest Radikal Süpürücü Aktivitesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, January 2021. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.530120>
- Yılmaz, B., Irmak, E. T., Turhan, Y., Doğan, S., Doğan, M., & Turhan, O. (2019). Synthesis, Characterization and Biological Properties of Intercalated Kaolinite Nanoclays: Intercalation and Biocompatibility. *Advances in Materials Science*, 19(1),

83–99. <https://doi.org/10.2478/adms-2019-0007>

Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., & Ünal, F. (2014). Gıda Koruyucuları ve Genotoksisite Testleri. *Gıda*, 39(3), 179–186. <https://doi.org/10.5505/gida.24861>

Zengin, Z. (2020). *GÜMÜŞHANE YÖRESİNDE ETNOBOTANİK BİR ÇALIŞMA*.

Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). 12 - Methods for the assessment of antioxidant activity in foods11This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the Journal of Functional Foods. In F. Shahidi (Ed.), *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (pp. 287–333). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9>

EKLER

EKLER

EK A: Etik Kurul Kararı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU					
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Phlomis Pungens Var. Hirta Bitkisinin Sitotoksik ve Antigenotoksik Etkilerinin Araştırılması"			
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU			
	AÇIK ADRESİ:	Çağış Yerleşkesi Uşak Yolu Üzeri, 10145 BALIKESİR			
	TELEFON	266 612 14 61-216707			
	FAKS				
	E-POSTA	bauklinetik@gmail.com			
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Serap DOĞAN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	BALIKESİR(BAÜN Fen Edebiyat Fakültesi)			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Fuat EREL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Şekil A.1: Etik Kurul Kararı Sayfa 1.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Phlomis Pungens Var. Hirta Bitkisinin Sitotoksik ve Antigenotoksik Etkilerinin Araştırılması"
-----------------------	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2021/132	Tarih:23.06.2021					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden izin alınması şartıyla gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının oybirliği ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Fuat EREL	Göğüs Hastalıkları AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Gülten ERKEN	Fizyoloji AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Akın USTA	Kadın Hastalıkları ve Doğum AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Eren ALTUN	Patoloji AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Elif AKSÖZ	Tıbbi Farmakoloji AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Mehmet ÇALIŞKAN	Halk Sağlığı Uzmanı	Balıkesir KEAS Organize Sanayi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av.Erman ARDA	Avukat	Serbest	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hüsnü KUNDAKÇI	Eczacı	Balıkesir Sağlık Uygulama ve Arş.Hast.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Serhat ALDEMİR	Emekli		E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Fuat EREL

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Şekil A.2: Etik Kurul Kararı Sayfa 2.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Franziska Johanna WILD KORKMAZ

Doğum tarihi ve yeri : 20.05.1996 / Ulm, Almanya

e-posta : franzii.wild@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi / Fen Edebiyat Fakültesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2020 - 2022
Lisans	Balıkesir Üniversitesi / Fen Edebiyat Fakültesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016 - 2020
Lise	Freie Waldorfschule Ulm Römerstrasse	2002 - 2015